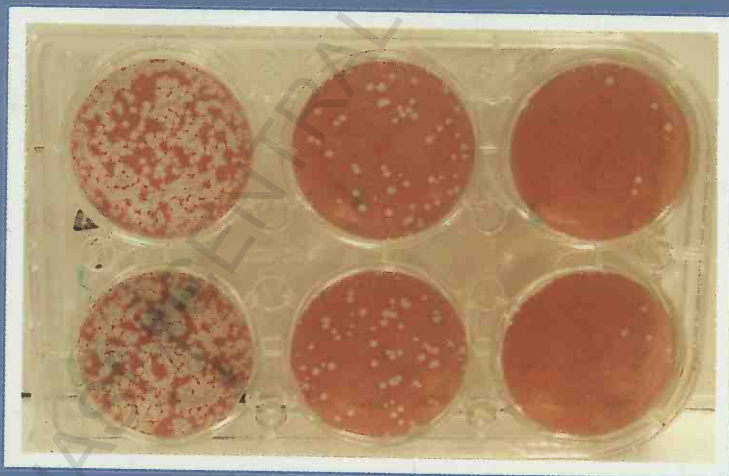


Costin Cernescu

Virusologie medicală



EDITURA MEDICALĂ

III-12483

Costin Cernescu

Virusologie medicală

B.C.U. IASI



794248



Editura Medicală
București, 2012

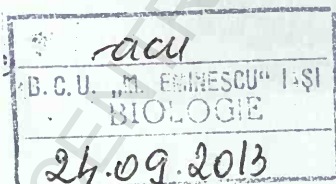
© „Toate drepturile editoriale aparțin în exclusivitate Editurii Medicale. Publicația este marcă înregistrată a Editurii Medicale, fiind protejată integral de legislația internă și internațională. Orice valorificare a conținutului în afara limitelor acestor legi și a permisiunii editurilor este interzisă și pasibilă de pedeapsă. Acest lucru este valabil pentru orice reproducere – integrală sau parțială, indiferent de mijloace (multiplicări, traduceri, microfilmări, transcrieri pe dischete etc.)”.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
CERNESCU COSTIN

Virusologie medicală/Costin Cernescu - București:
Editura Medicală, 2008

ISBN 978-973-39-0637-7

578.7(075.8)



Redactor ce carte: **IRINA BELOIU**
Secretar de redacție: **MARIA ELENA NEAMȚ**
Tehnoredactor: **MIHAI ȘTEFĂNACHE**
Corector: **CORINA GHINOIU**

SUMAR

ARGUMENT.....	5
INTRODUCERE.....	7
1. GENERALITĂȚI DESPRE VIRUSURI	11
2. TAXONOMIE VIRALĂ	23
3. REPLICAREA VIRUSURILOR	35
4. GENETICA VIRUSURILOR ANIMALE	43
5. FUNCȚIONAREA CELULEI PARAZITATE VIRAL.....	51
6. PATOGENIA INFECȚIEI VIRALE.....	59
7. PERSISTENȚA VIRALĂ	67
8. MECANISME ALE REZISTENȚEI ÎNNĂSCUTE ÎN VIROZE	75
9. IMUNITATEA ÎN VIROZE.....	81
10. INTERFERONI	95
11. PRINCIPALELE SINDROAME DE ETIOLOGIE VIRALĂ.....	101
12. VACCINURI VIRALE.....	113
13. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR.....	125
14. PICORNAVIRIDAE	141
15. GASTROENTERITE VIRALE	155
16. CORONAVIRIDAE	165
17. ORTOMIXOVIRIDAE.....	171
18. INFECȚIA UMANĂ CU TULPINI DE GRIPĂ AVIARĂ	187
19. PARAMIXOVIRIDAE	201
20. ARBOVIRUSURI	215
21. RHABDOVIRIDAE.....	227
22. FILOVIRIDAE	237
23. RETROVIRIDAE	243
24. VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV/SIDA)	249
25. HEPATITE VIRALE	265
26. PARVOVIRIDAE	291
27. HEPADNAVIRIDAE.....	299
28. ADENOVIRIDAE	317
29. PAPOVAVIRIDAE	325
30. HERPESVIRIDAE	333
31. POXVIRIDAE	349
32. VIROZE EMERGENTE.....	363
33. BOLI PRIONICE.....	371
34. VIRUSURI ȘI CANCER.....	381
35. MONITORIZAREA TERAPIEI ANTIVIRALE.....	393
INDEX	403

ARGUMENT

Studiul virusurilor animale, vegetale sau bacteriene (fagi) a avut o importanță decisivă în realizările biologiei moleculare din ultimele două decade. Multe premii Nobel pentru Medicină și Fiziologie, decernate în acest ultim interval, au revenit unor virusologi (Baltimore, Temin, Blumberg, Gajdusek, Dulbecco, Varmus, Bishop etc.). Concomitent cu aceste descoperiri fundamentale, multe schimbări s-au produs în domeniul virusologiei clinice. Viroze altă dată pandemice au fost eradicate (variola) sau sunt pe cale de a fi drastic reduse ca incidență (poliomielita, rujeola). Noi viroze atrag atenția autorităților sanitare (hepatitele virale, SIDA, gripa aviară, encefalopatiile subacute spongiforme etc.). Pe măsura înțelegerii ciclului replicativ viral, fiecare etapă a acestuia a devenit o țintă posibil de interferat. Până în 1990 existau doar câteva medicamente active pe virusurile gripale și pe virusurile herpetice. Astăzi, peste 50 de antivirale sunt aplicate în clinică, iar încă atâtea sunt în trialuri avansate. Virusologia ultimei decade este puternic marcată de impactul tehnologiilor moderne de cercetare. S-a spus că cercetătorul se aseamănă celor ce înaintează într-un teren mlăștinos. Primul pas cu care se tatonează terenul se cheamă tehnologie, următorul, știință. Riscul ca al doilea pas să nu fie în van este minimizat de accesul la tehnologie. Informațiile prezentate în acest manual cuprind, pe lângă datele clasice, și semnalarea unor probleme care au fost soluționate prin abordarea lor cu tehnologiile ultimilor ani.

Textul este destinat studenților în medicină și medicilor rezidenți de laborator sau de orice altă specialitate interesați în actualizarea cunoștințelor specifice acestui important capitol de patologie infecțioasă. În cea mai mare parte este rezumat conținutul cursurilor de virusologie ținute în anul universitar 2004-2005, la Facultatea de Medicină Generală, Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București.

Prof. Dr. Costin Cernescu

Membru al Academiei de Științe Medicale

Membru corespondent al Academiei Române

INTRODUCERE

Ultimii 50 de ani au produs mai multe schimbări decât cei 500 de ani precedenți, iar ultimii 500 de ani au adus mai mult progres decât cei 5 000 de ani premergători. Dezvoltarea științifică, economică și socială s-a manifestat în toate domeniile. Viitorul nu va fi o extensie a trecutului, ci va marca o despărțire de practicile tradiționale predate în universitățile de astăzi. În medicină, biotehnologia și nanotehnologia, alături de ramuri noi, încă la început, precum medicina regenerativă sau inteligența artificială, vor deschide posibilități de tratament și prevenție multor boli redutabile. Computerele secolului XXI vor deveni inteligente într-un fel diferit de inteligența umană. Această inteligență artificială se va putea autoperfecționa, devenind mai performantă, cu un ritm accelerat progresiv. Mulți vizionari prevăd o "mare tranziție" în secolul XXI, planeta noastră devenind, dintr-un spațiu cu potențial autodistructiv, o planetă inteligent condusă. Marile pericole prezente: violența anarhică, terorismul, distrugerea mediului ambiant, cu consecințele lor (sărăcia, epuizarea resurselor energetice, suprapopulația, pandemiile etc.), vor putea fi depășite grație progreselor științei și tehnologiei. Civilizația are 50/50 șanse să supraviețuiască, poate progresa inimaginabil sau se poate prăbuși. Soluțiile nu trebuie așteptate numai de la computerele suprasofisticate sau de la extensia computerizată a creierelor ci, în primul rând, de la educație și de la capacitatea de a înțelege forța și pericolele progresului.

Epoca de aur a virusologiei începe în 1949, când Enders, Weller și Robins introduc culturile de celule ca substrat pentru propagarea poliovirusurilor, a virusului rujeolos și a virusului ruzeolei etc. *Renato Dulbecco* descrie în 1952 metoda plajelor pentru cuantificarea precisă a concentrației virusurilor.

După 1970, virusologia devine o disciplină indispensabilă revoluției biotehnologice. Temin și Mizutani și, separat, David Baltimore, descoperă reverstranscriptaza - enzima care răstoarnă dogma centrală a biologiei moleculare. P. Sharp, lucrând cu adenovirusuri, descoperă în 1977 că genele conțin porțiuni non-codante (introni), alături de cele transcrise (exoni) și precizează modul de procesare al ARNm prin excluzia intronilor. Descoperirea oncogenelor și a rolului lor în transformarea celulară (Bishop și Varmus) a însemnat o altă contribuție importantă a virusologiei în biologia cancerului. În fine, în 1996 premiul Nobel pentru Medicină și Fiziologie revine lui Doherty și Zinkernagel pentru precizarea dublei restricții în răspunsul imun antiviral.

În România, virusurile au constituit preocuparea marilor precursori. Victor Babeș este cel care a introdus seroprofilaxia în rabie, Gheorghe Marinescu are studii clasice privind propagarea virusului herpes simplex către sistemul nervos central, iar Constantin Levaditi a izolat primul poliovirus pe explant de celule umane.

Opera științifică a lui Babeș, diversă și originală, a lăsat pietre de hotar în virusologie. Cele mai valoroase contribuții sunt legate de studiul rabiei, iar descoperirile savantului român vor fi totdeauna menționate așa cum au rămas sintetizate în primul tratat publicat în lume asupra acestui subiect (Victor Babeș: *La rage*, Ed. Bailliere, Paris, 1912).

Contribuțiile lui Babeș în studiul infecțiilor (dovedite ulterior) virale nu se limitează numai la rabie. El a făcut studii experimentale în vaccină, variolă, febră galbenă, jigodie etc. Un nou agent patogen a izolat Babeș în 1888: *Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf*. [C.R. Acad. Sci., série III, Science-Vie 1888;107:692-694]. Ca o recunoaștere a acestei priorități, numele lui Babeș este dat unui gen de paraziți - *Babesia* - răspândit la mai multe specii domestice (cai, bovine, ovine etc.), dar asociat și cu infecții umane.

Clasici ai medicinei românești și universale, între care Levaditi, Ghe. Marinescu, Pascu Atanasiu etc. și-au început cariera în primul Institut de Medicină Experimentală creat de Babeș la București, în 1887 (actualul Institut Babeș, pe Cheiul Dâmboviței).

Levaditi (1874-1953) a avut contribuții seminale în virusologie, sifilografie și în chimioterapie. În 1909, împreună cu Karl Landsteiner (pemiul Nobel - 1930) demonstrează prezența virusului polio în alte țesuturi decât cel nervos: în secrețiile nazofaringiene, în glandele salivare și în ganglionii limfatici intestinali.

Levaditi este autorul principal al primelor tratate de virusologie "*Les ultravirus des maladies humaines*" (ediția I în 1937, ediția a II-a în 1948, Librairie Maloine, Paris, France) și "*Les ultravirus des maladies animales*" (1943). A fost un mare cercetător european care, în ciuda animozității franco-germane de la începutul secolului XX, a lucrat și s-a remarcat atât în laboratoarele germane, cât și la Institutul Pasteur din Paris.

Una din cele mai importante lucrări pentru care Nicolau (1896-1967) este citat și astăzi a fost asupra infecției cu bornavirusuri: Nicolau SȘt. & Galloway I.A: "*Borna disease and enzootic encephalomyelitis of sheep and cattle*". [Rep. Ser. Med. Res. Council 1928; 121:7]. Rolul bornavirusurilor într-o serie de psihoze sau tulburări de comportament este investigat de mai mulți cercetători, iar meritul precursor al lui Nicolau a fost subliniat de o monografie recentă: *Borna Disease Virus and its role in neurobehavioural disease* [K.M. Carbone (ed.) ASM Press 2002, Washington DC].

Relația virus - cancer a fost o constantă a preocupărilor profesorului Nicolau care, inoculând neurovaccina în tumorii grefate, descoperă oncoliza virală. Acest fenomen a sugerat ideea unei posibile bioterapii în cancer [Levaditi C., Nicolau S. *Virus et tumeurs*. *Ann. Inst. Pasteur* 1923; 37:1-3]. Oncoliza virală este reluată în prezent prin utilizarea vectorilor virali în terapia genică a cancerului. Cu o remarcabilă intuiție, Nicolau a susținut o teorie amplu confirmată azi privind potențialul oncogen al acizilor nucleici virali.

Ștefan S. Nicolau este și fondatorul Institutului de Virusologie al Academiei Române. Institutul de Virusologie "Ștefan S. Nicolau" este cronologic unul din primele în această specialitate în Europa (1949). Institutul a fost creat pornind de la nucleul Catedrei, care și-a început activitatea în 1942, la Facultatea de Medicină din București. Pentru prima oară în lume, în învățământul medical superior, o disciplină separată era consacrată studiului agenților infecțioși ultrafiltrabili.

Catedra și Institutul de Virusologie au fost conduse 30 de ani de academicianul Nicolae Cajal (1919-2004). Cajal a avut cercetări esențiale pentru inițierea și perfecționarea vaccinurilor virale (vaccinurile polio viu atenuat, gripal și rujeolos), studiind căi alternative de administrare, metode moderne de preparare și control.

Contribuțiile majore în domeniul virusologiei aduse de academicianul Cajal și colaboratorii săi au constituit obiectul unor lucrări monografice, dintre care cităm: "*Diagnosticul de laborator al inframicrobiозelor umane*" (1958), "*Poliomielita*" (1961), "*Turbarea*" (1962), "*Metodele laboratorului clinic*" (1964), "*Elemente de inframicrobiologie generală*" (1965), "*Hepatitele virale*" (1974), "*Encefalitele și encefalopatiile virale cu evoluție lentă*" (1974), "*Rujeola, etiopatogenie și profilaxie*" (1978), "*Enterovirozele nepoliomielitice*" (1983), "*Patogenia infecțiilor virale cronice*" (1983). Sub redacția academicianului N. Cajal a apărut în 1990 primul volum al unui remarcabil tratat de Virusologie Medicală.

Numeroși cercetători români s-au afirmat la școala pasteuriană, iar documente revelatoare pot fi găsite în arhiva Institutului Pasteur (www.pasteur.fr/infosci/archives) pentru: Jean Cantacuzene (Ion Cantacuzino) 1863-1934, Constantin Levaditi, Ștefan Nicolau, Pascu Atanasiu (1913-1995), Radu Portocală (1915-1993) etc.

CAPITOLUL 1

GENERALITĂȚI DESPRE VIRUSURI

De reținut:

Virusurile ocupă o poziție unică în biologie prin talia extrem de mică și parazitismul obligatoriu intracelular. Genomul virusurilor este constituit dintr-o singură specie de acid nucleic (ARN sau ADN), care se multiplică prin replicare. Etiologia virală a unor infecții este argumentată de satisfacerea postulatelor lui Koch, cu corecturi aduse de metodele moderne de diagnostic și de identificare genomică.

Microorganismele care parazitează organismul uman pot fi enumerate în ordinea descrescătoare a taliei și complexității lor astfel (fig. 1.1):

- protozoare și fungi;
- bacterii și mycoplasme;
- rickettsii și chlamydii;
- virusuri și prioni.

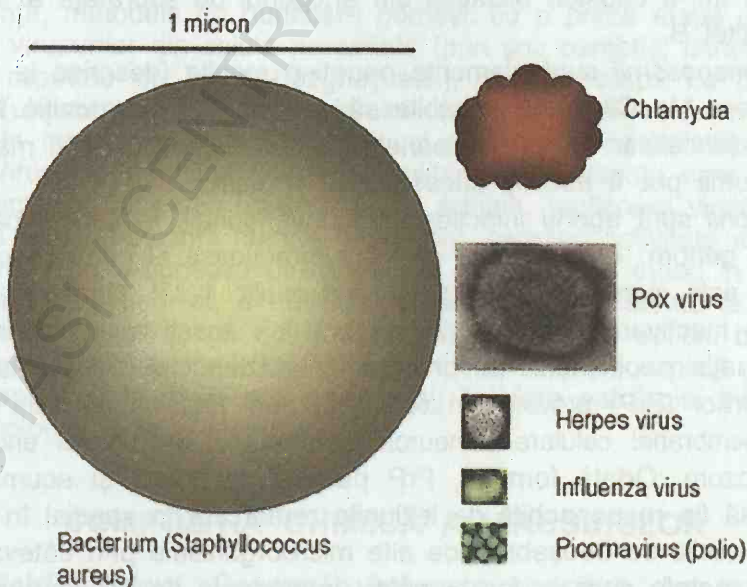


Fig. 1.1. Comparație între talia bacteriilor (*Staphylococcus aureus*) și a virusurilor.

Virusurile și prionii sunt considerate ca microorganisme parazitare cu totul inferioare, incapabile să se multiplice în afara unei celule gazdă, fără suportul metabolic și energetic al acesteia.

Ani de controverse au dezbătut problema virusurilor ca forme "vii" sau "ne-vii". Stanley, în 1935, a cristalizat virusul mozaicului tutunului, Gierer și Schramm, în 1956, au demonstrat infecțiozitatea acidului nucleic viral, Spiegelman și Kornberg, în 1961, au probat "multiplicarea" in vitro, în tuburi de cultură, a acizilor nucleici virali purificați. Deci, particule virale tipice au putut fi obținute din constituenții purificați ai virionilor, ceea ce pledează pentru considerarea virusurilor ca forme vii.

O serie de agenți subvirali cu potențial patogen pentru plante, animale și om au fost caracterizați mai recent. Aici sunt incluși viroizii, agenții sateliți, transposomii și prionii.

Viroizii sunt molecule de ARN circular, nu mai mari de 200-400 de nucleotide, fără capsidă sau anvelopă, care determină unele boli transmisibile la plante.

Virusoizii, sau agenții sateliți, au un genom mai mare decât viroizii (1 000 de nucleotide). Strategia lor replicativă depinde de coinfecția simultană cu un virus a cărui capsidă o folosesc. Un exemplu îl constituie "virusul" hepatitei D (delta), al cărui genom ARN se învește într-o capsidă alcătuită din antigenul de suprafață al virusului hepatitei B.

Transposomii sunt elemente genetice mobile (descrise la plante de Barbara Mc Clintock), capabile să se mute dintr-o poziție în alta în genomul celular. În spiritul teoriei evoluției regresive (vezi mai jos), transposomii pot fi socotiți ancesori ai virusurilor.

Prionii sunt agenți infecțioși nonconvenționali, în sensul că sunt lipsiți de genom. Ei reprezintă proteine infecțioase al căror mecanism replicativ este numai parțial sugerat (vezi capitolul 33). Rezistența deosebită la inactivare a prionilor a sugerat că acești agenți reprezintă o combinație neobișnuită de proteine și acizi nucleici. Proteina asociată prionilor (PrP) provine din conversia unei proteine normale de la nivelul membranei celulare a neuronilor în cursul parcursului endocitar către lizozom. Odată formată, PrP persistă în celulă și acumularea ei pare să fie responsabilă de leziunile remarcate în special în SNC.

Virusurile se deosebesc de alte microorganisme prin câteva proprietăți generale care le fac complet dependente de celula gazdă în ceea ce privește realizarea ciclului lor replicativ.

PROPRIETĂȚI GENERALE

Virusurile cultivă numai pe substraturi vii: animale de laborator, ou de găină embrionat și culturi de celule. Ele nu au ribozomi - deci mecanisme de sinteză proteică, nu au mitocondrii - deci nu au surse proprii de energie. Organizarea simplă a virusurilor le face complet dependente de metabolismul celulei gazdă. Pe de altă parte, majoritatea substanțelor antivirale nu pot discrimina între afectarea metabolismului gazdă și cel al parazitului, ceea ce explică toxicitatea lor considerabilă.

Genomul viral este constituit numai dintr-o singură specie de acid nucleic, fie ADN, fie ARN, niciodată ambele la același virus. Ca urmare, indiferent de specie, acidul nucleic viral conține întreaga informație genetică necesară multiplicării și codificării celorlalte structuri virale care alcătuiesc particula elementară infectantă sau virionul. Multiplicarea virusurilor este diferită de cea a bacteriilor. Ultimele se înmulțesc prin diviziune binară, în timp ce virusurile sintetizează copii multiple pe o matriță unică, constituită de acidul nucleic viral (acest proces fiind numit replicare).

Talia virusurilor este de 10-100 de ori mai mică decât a bacteriilor. Dimensiunea particulei virale se exprimă în nanometri ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), iar a celulelor bacteriene în microni ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$). Ca urmare, virusurile pot fi vizualizate la microscopul electronic și, de obicei, nu sunt reținute de filtrele bacteriene, sunt ultrafiltrabile.

Parazitismul strict intracelular și imposibilitatea de a fi reținute de filtrele bacteriene fac purificarea virusurilor deosebit de laborioasă. În esență, metodele de purificare pornesc cu o primă etapă de eliberare a virusurilor din celula parazitată (prin șoc osmotic, ultrasonicare, cicluri repetate de îngheț-dezgheț etc.), urmând etape de purificare fizică (ultracentrifugare) sau chimică (adsorbție pe coloane diferite, eluție în tampoane cu osmolaritate și pH riguros controlate).

Virusurile sunt insensibile la antibiotice, substanțe care au acțiune bacteriostatică sau bactericidă. În schimb, replicarea virală induce sinteza unor substanțe numite interferoni, care au activitate antivirală. Interferonii nu acționează direct asupra virusurilor, ci induc în celulele încă neparazitate o stare antivirală care le face rezistente la infecție. Interferonii au, pe lângă activitatea antivirală, și alte acțiuni biologice: anticelulară, antitumorală, imunomodulatoare, ceea ce explică utilizarea lor terapeutică în multe alte specialități în afara patologiei infecțioase (hematologie, oncologie etc.).

COMPOZIȚIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Acizii nucleici. Genomul viral este constituit dintr-o singură specie de ARN (la ribovirusuri) sau de ADN (la dezoxiribovirusuri).

Greutatea moleculară variază între 1,6 și 160 x 10 daltoni, iar capacitatea de codificare corespunde la un număr între 3 și 160 de cistroni.

Conținutul în G + C (guanină + citozină) poate varia între 35-75%, ceea ce indică o diversitate mult mai pronunțată între virusuri decât în cadrul altor grupuri taxonomice. În plus, în cursul replicării virale se pot produce încorporări eronate de nucleotizi, ceea ce determină apariția de variante, uneori cu semnificație clinică. Frecvența încorporărilor greșite este mai amplă (cu circa două ordine de mărime) la virusurile ARN decât la dezoxiribovirusuri. De notat că în genomul viral există regiuni înalt conservate și regiuni variabile, ceea ce asigură, pe de o parte, păstrarea identității fiecărei familii, gen sau specie virală, pe de altă parte, variabilitatea continuă și adaptarea la factorii presori ai selecției naturale.

Genomul ADN poate fi simplu (ss) sau dublu spiralat (ds), linear, circular sau supraînfășurat. Genomul ARN se poate prezenta la fel, ss sau ds, continuu sau fragmentat. În cazul genomului ARNss, unele virusuri sunt cu polaritate pozitivă, respectiv, genomul servește ca ARNm, sau cu polaritate negativă (antimesaj) - când numai spira complementară genomului poate funcționa ca ARNm.

Acidul nucleic viral este suportul infectivității virusurilor, proprietate care se poate exprima uneori fără a fi necesară prezența celorlalte structuri virale și în special a proteinelor. Proteinele virale sunt suportul antigenității virusurilor, respectiv, a capacității acestora de a determina un răspuns imun specific în organismul gazdei parazitată.

Proteinele virale asigură formarea învelișurilor externe ale virionului care protejează genomul viral. Unele proteine sunt intim legate de genomul viral, având un pronunțat caracter histic și intră în compoziția nucleocapsidei virale. Alte proteine participă la alcătuirea învelișurilor: capsida și anvelopa virală. Capsida și anvelopa rezultă din asamblarea unor subunități identice numite capsomer, respectiv, peplomer.

Fiecare capsomer este alcătuit din unul sau mai multe lanțuri polipeptidice. Din rațiuni de economie a codificării, capsida este alcătuită din unități repetabile care se assemblează după două forme de simetrie: helicoidală și icosaedrică.

În afara acestor proteine structurale, genomul viral mai codifică și proteine funcționale, de regulă enzime, care intervin în replicarea genomului. Unele familii virale conțin aceste enzime încorporate în particula virală matură, de exemplu, reverstranscriptaza în cazul retrovirusurilor. Nivelul activității enzimatice este proporțional cu numărul de particule infectante sau, altfel spus, cu încărcarea virală.

Proteinele care participă la alcătuirea învelișului extern sau anvelopei virale sunt, de regulă, glicozilate și la microscopul elec-

tronic apar ca niște proiecții pe suprafața virionului. Dacă anvelopa și capsida virală protejează genomul de acțiunea nucleazelor celulare, asamblarea capsomerelor și peplomerelor în structuri simetrice face proteinele virale rezistente la acțiunea enzimelor proteolitice.

Lipidele sunt părți componente ale anvelopei virale fiind însă preluate din membrana celulei gazdă, deci nespecificate de genomul viral. De altfel, după tratamentul cu solvenți lipidici (eter, cloroform, săruri biliare), virusurile anvelopate sunt inactivate, însă ele se pot reface morfologic și în urma adăririi de lipide sintetice.

Inactivarea virusurilor. Mulți agenți fizici și chimici pot inactiva virusurile, ceea ce este relevant nu numai pentru dezinfectie, dar și pentru producția de vaccinuri virale. Trebuie făcută distincția între agenții virulicizi, care inactivează infectivitatea prin acțiunea denaturantă asupra componentelor chimice ale virionului, și agenții virustatici, care numai inhibă replicarea virusurilor.

Căldura: majoritatea virusurilor sunt termolabile chiar la temperaturi între 20°-50°C. Stocajul virusurilor se face de regulă la 4°C sau, mai bine, la temperaturi foarte scăzute în zapadă carbonică (-70°C) sau azot lichid (-196°C). Timpul de înjumătățire (sau semiviața) infectivității pentru cele mai multe virusuri se măsoară în:

- secunde, la 60°C; minute, la 37°C;
- ore, la 20°C; zile, la 4°C;
- luni, la -70°C; ani, la -196°C;

Virusurile anvelopate sunt mai termolabile. Îngheț-dezghețul repetat compromite infectivitatea multor virusuri. O metodă utilă de stocare este liofilizarea: deshidratarea prin sublimare a suspensiilor virale înghețate la -70°C și procesate în vid.

pH-ul afectează infectivitatea, de regulă, la extremele spectrului: sub 4 (acid) sau peste 9 (alcalin). Unele virusuri rezistă însă bine la valori depărtate de cele fiziologice. Concentrațiile ridicate ale unor ioni (Mg^{2+}) stabilizează virusurile atât la temperaturi improprii, cât și la pH acid.

Radiațiile ionizante (U-V, gamma, X etc.) inactivează virusurile în raport cu dimensiunea particulei virale, cu conținutul și structura acidului nucleic, cu concentrația de virioni în suspensie.

O serie de *agenți chimici* acționează ca antiseptice și dezinfectante: formaldehida, hipocloritul de sodiu, detergenții. Clorinarea apei potabile nu reușește uneori (când conținutul în substanțe organice este mare) să inactiveze toate virusurile. Virusurile neanvelopate: enterovirusurile, reovirusurile etc., sunt mai rezistente la procedeele de tratare a apei.

MORFOLOGIA VIRUSURILOR

Virionul sau particula elementară este alcătuită dintr-un miez genomic ARN sau ADN și din învelișuri proteice: capsida și, uneori, anvelopa. Capsida este alcătuită din capsomere asamblate prin legături noncovalente. Fiecare capsomer este compus din 1-6 polipeptide. Cu toate acestea, la unele virusuri pot fi găsite capsomere cu compoziție chimică diferită în funcție de poziția în capsidă.

Asamblarea capsomerelor se face după regulile simetriei icosaedrice sau helicoidale. Aceste două tipuri de simetrii se pot combina rezultând alte trei variante: anvelopată icosaedrică, anvelopată helicoidală și complexă (fig. 1.2).

Simetria icosaedrică. Icosaedrul este un corp geometric cu 20 de fețe, fiecare fiind un triunghi echilateral. Există axe de simetrie de rotație dublă (care trec prin vârfuri), triplă (care trec prin laturi) și quintuplă (care trec prin fețe). Celebrul arhitect Buckminster Fuller, autorul domurilor geodezice, a aplicat regulile simetriei icosaedrice la construcțiile (hangare, săli polivalente etc.) care includ volum maxim pentru suprafața minimă de acoperire, principiu ce se aplică și virusurilor.

5 BASIC TYPES OF VIRAL SYMMETRY

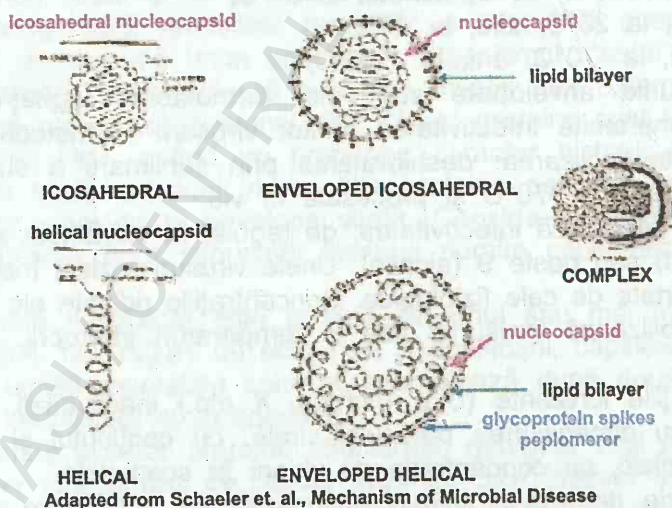


Fig. 1.2. Schema principalelor reguli de simetrie care determină asamblarea componentelor virionului.

Capsomerele alcătuiesc grupe de 5 sau 6 unități, iar numărul total per capsidă (N) este dat de formula simplă: $N = 10(n-1)^2 + 2$,

unde n este numărul total al capsomerele vizibile pe o latură a icosaedrului. Deci, numărul de capsomere poate fi 42, 92, 162, 252.

Simetria helicoidală este caracteristică virusurilor cu nucleocapsidă, unde capsomerele se aranjează urmând helixul acidului nucleic. În general, aceste virusuri au un singur fel de capsomere, au formă cilindrică și un al doilea înveliș exterior numit anvelopă. Învelișuri suplimentare numite membrane sau tegument apar la virusurile mai complicate: herpesvirusuri, poxvirusuri. Rotavirusurile au două capside suprapuse.

PROCEDEE DE CULTIVARE A VIRUSURILOR

Virusurile sunt paraziți intracelulari care nu se pot replica pe medii sintetice. Cultivarea lor este indispensabilă studiilor detaliate de biologie virală, testării substanțelor antivirale, producției de vaccinuri. Unele virusuri nu au putut fi încă cultivate în laborator, singurele "gazde" fiind maimuțele hominoide. Există trei sisteme virus-gază utilizate în prezent: animalele de experiență, oul de găină embrionat, culturile de celule.

Animalele de experiență: nu numai în virusologie, dar și în alte discipline, folosirea animalelor de experiență este limitată azi. Cauzele sunt, pe de o parte, sistemele alternative mai ieftine și fiabile (în primul rând, culturile de celule); pe de altă parte, impactul puternic pe care principiile etice promovate de organizațiile pentru protecția animalelor îl are în societatea contemporană (tabelul 1.1). Sistemul de evaluare propus în tabel stabilește un punctaj "prag" rezultat din însumarea cifrelor fiecărui aspect considerat. Un minim de respect etic nu acceptă experimente în care punctajul rezultat din însumarea cifrelor de la punctele A - D este peste 15.

TABELUL 1.1

SISTEM DE EVALUARE PENTRU MINIMALIZAREA SUFERINȚELOR ANIMALELOR ÎN EXPERIMENTE BIOLOGICE

A. Scopul experimentului:

1. evitarea durerii la om,
2. evitarea suferinței la om,
3. ameliorarea sănătății omului,
4. ameliorarea bunăstării omului,
5. ameliorarea cunoștințelor omului.

B. Șansa de reușită a experimentului:

1. excelent,
2. foarte bun,

3. bun,
4. limitat,
5. improbabil.

C. Specia animalului:

1. fără sensibilitate (moluște),
2. cu ceva sensibilitate (pești, amfibii),
3. cu conștiință (reptile),
4. cu conștiință și sentimente (mamifere),
5. inteligente (primare, carnivore, cetacee).

D. Suferința animalului în experiment:

1. deloc,
2. minimă,
3. moderată,
4. mare,
5. severă.

E. Durata suferinței:

1. deloc,
2. scurtă,
3. moderată,
4. lungă,
5. f. lungă.

F. Durata experimentului:

1. extrem de scurtă,
2. scurtă,
3. moderată,
4. lungă,
5. foarte lungă.

G. Număr de animale:

1. 1-5,
2. 5-10,
3. 10-20,
4. 20-100,
5. 100.

H. Calitatea îngrijirii animalelor:

1. excelentă,
2. foarte bună,
3. bună,
4. medie,
5. rea.

Dogma necontestată în trecut "*humans come first*" este înlocuită de o atitudine mai generoasă față de tot ce este viu. Animalele de experiență nu sunt un simplu instrument de cercetare și utilizarea lor trebuie (în spiritul lui Albert Schweitzer) "*să evite suferința oricând este posibil*". Experimentele pe animale de laborator rămân indispensabile în studiul patogeniei virozelor, al răspunsului imun, pentru testarea inocuității unor medicamente sau vaccinuri. Cercetarea științifică a ameliorat utilizarea acestui sistem, producând animalele "*germ free*", liniile consanguinizate, șoarecii transgenici etc. Standardizarea

condițiilor de îngrijire și manipularea genetică a animalelor a optimizat reproductibilitatea rezultatelor experimentale.

Oul de găină embrionat (introdus de Goodpasture) oferă țesut embrionar pentru cultivarea virusurilor. Acest sistem este aplicabil pentru foarte multe familii virale, pentru că susceptibilitatea embrionului este net superioară animalelor tinere sau adulte. Ouăle sunt inoculate pe diverse căi și, în funcție de organul vizat, vârsta embrionului poate varia între 5-14 zile de la debutul embrionării. Din ce în ce mai puțin folosite în izolarea virusurilor, ouăle de găină embrionate și-au păstrat importanța în prepararea unor vaccinuri virale (gripal).

Culturile de celule au fost introduse în virusologie în 1949, de Enders, Weller și Robbins, care au primit Premiul Nobel pentru cultivarea virusurilor poliomielitice in vitro, în celule nonneuronale și pentru evidențierea leziunilor histologice consecutive. Trebuie menționat că, mulți ani înainte, Constantin Levaditi reușise același lucru pe explant de țesut nervos de la maimuțe. De atunci, culturile de celule au rămas sistemul virus gazdă predilect în virusologia clinică și în cercetare. Tipurile de culturi folosite sunt: culturile primare, liniile celulare și tulpinile diploide. Lor li se adaugă uneori culturile de organ și explantul de țesut. Modificările histologice determinate de replicarea virală în culturi de celule definesc efectul citopatic (ecp).

METODE CANTITATIVE DE EVALUARE A INFECTIVITĂȚII

Studiul virusurilor depinde de practicarea unor metode reproductibile de cuantificare a infectivității și a altor proprietăți biologice. Numărul virionilor într-o suspensie virală poate fi estimat prin metoda diluțiilor sau "titrare". Infectând unul din sistemele virus-gazdă cu diluții succesive ale unei suspensii virale, în câteva zile se poate estima cantitativ nivelul multiplicării virale.

Aprecierea se face prin teste cantitative sau quantale (fig. 1.3; tabelul 1.II). În testele cantitative (de exemplu, formarea plajelor - Dulbecco) unui focar infectant îi corespunde, de regulă, un virion. În testele quantale nu se înregistrează numeric particulele virale, ci prezența sau absența lor la o anumită diluție. Ca urmare, rezultatele se exprimă în urma unor prelucrări statistice în funcție de succesiunea și rata diluțiilor, de numărul de animale sau tuburi de cultură inoculate în fiecare diluție etc.



Fig. 1.3. Plaje de virus rujeolos pe linia VERO (de la stânga; diluții începând cu 500 PFU/ml).

TABELUL 1.II

COMPARAREA TITRĂRII CANTITATIVE ȘI QUANTALE A INFECTIVITĂȚII

Diluția	Estimare cantitativă (plaje)	Estimare cantală (ecp)
1/100	plaje confluențe	+ + + +
1/1 000	55, 50, 45, 59	+ + + +
1/10 000	5, 6, 4, 6	0 + 0 +
1/100 000	0, 1, 1, 0	0, 0, 0, 0
1/1 000 000	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0

Fiecare diluție se inoculează pe cel puțin patru godeuri, de aceea apar patru cifre la estimări. Rezultatele se exprimă în unități formatoare de plaje (PFU) sau în doze infectante 50% pentru culturi celulare (DIC_{50}).

POSTULATELE LUI KOCH

Relația cauzală dintre infecția virală și boală este probată numai în cazul satisfacerii următoarelor postulate propuse de Koch, în 1882, referitor la infecțiile bacteriene:

1. Virusul implicat trebuie izolat de la majoritatea cazurilor de îmbolnăviri similare.
2. Virusul trebuie izolat într-un sistem gazdă reproductibil.
3. Virusul izolat reproduce boala umană în cazul inoculării la animale susceptibile.

4. De la animalele bolnave se izolează virusul inițial.

Deși toate aceste deziderate pot fi probate, în multe cazuri izolarea virusurilor este greoaie sau imposibilă, ceea ce nu exclude etiologia virală. Tehnologii moderne de evidențiere a genomului viral sau a unor fragmente ale sale sunt acceptate ca probe specifice pentru etiologia virală. Astfel de probe au fost aduse în boli în care, în trecut, participarea virusurilor era privită cu rezerve: unele boli maligne, boli autoimune, boli metabolice și degenerative etc.

Postulatele lui Koch definesc caracteristicile bolilor infecțioase sau transmisibile, dar creează și premisele pentru înțelegerea altor situații în care eticheta de virus este aplicată numai în sens metaforic. De exemplu, este cunoscut termenul de virus în lumea calculatoarelor, cazul tipic fiind cel al virusului Michelangelo, a cărui apariție este așteptată în fiecare an, la 6 martie, ziua de naștere a celebrului renașcentist.

Virusurile calculatoarelor compromit sistemul operațional al unui computer în același mod în care un virus real subminează metabolismul celular deturnându-l în folosul sintezei particulelor virale noi, progene. Mecanismul transmiterii virusurilor la calculatoare este similar cu ceea ce se întâmplă în natură: floppy discurile infectate contaminatează hard discul calculatorului care, la rândul său, generează floppy discuri infectate (verificând în acest mod postulatele lui Koch). Este interesantă continuarea comparației care relevă că prezența virusului în hard nu are un efect imediat - rezultatul este inițiat numai în ziua de naștere a lui Michelangelo, odată cu afișarea datei pe ecran. Strategia replicării virale utilizează același procedeu în infecțiile latente care permit perpetuarea infecției chiar în lipsa unor subiecți susceptibili. Inventatorii virusurilor în informatică au fost conștienți că șansa de propagare a virusurilor este mai mare în cazul unei latențe prelungite, a unei prezențe silențioase. Creatorii virusurilor calculatoarelor au fost programatori adolescenți care și-au propus să interfereze banca de date a Pentagonului. Ulterior, programele au evoluat, existând în prezent sisteme antivirus care acționează profectiv. Totuși, această aventură nu a adus numai necazuri; ea a creat unul din cele mai eficiente mijloace pentru realizatorii de softuri, pentru protecția prin copyrights a propriilor programe. Este ceea ce se întâmplă în cazul virusurilor reale: strategia replicării unora dintre ele este folosită în biotehnologie sau în genetică, promovând tehnologii care vor aduce multe rezultate interesante în viitor.

Sinteză

Virusurile sunt alcătuite din genom (ARN sau ADN) protejat de învelișuri proteice (capsidă și anvelopă). Alcătuirea capsidei ca și a anvelopei se bazează pe asamblarea simetrică a unor subunități. Structurile proteice numite capsomere, respectiv, peplomere, sunt soli-

darizate în învelișuri continue după regulile simetriei icosaedrice (cubice) sau helicoidale.

Genomul este purtătorul infectivității virale; capsida sau anvelopa determină antigenicitatea virusurilor.

BIBLIOGRAFIE

Bos L. International naming of viruses - a digest of recent developments. Arch. Virol. 2002;147:1471-7.

Cann AJ. Principles of Molecular Virology. Academic Press, 1993.

Harrison SC. Principles of virus structure, In Field's Virology. Raven Press, New York, 2003, p. 37-61.

Mahy BWJ. A dictionary of virology, 3rd ed. Academic Press, London, 2001.

TAXONOMIE VIRALĂ

De reținut:

Taxonomia virală actuală desparte ribovirusurile (genom ARN) de dezoxiribovirusuri (genom ADN). În aceste regnuri, virusurile se grupează (de la simplu la complex) în tulpini, specii, genuri, subfamii, familii și ordine, după criteriul înrudirii în secvența nucleotidelor din genom. Criteriile pragmatice în taxonomie (după calea de transmitere, după localizarea simptomelor etc.) sunt azi depășite. Actualizările, din ce în ce mai frecvente, ale taxonomiei virale pot fi aflate prin Internet la următoarea adresă: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>

Istoric. Sistemul universal de taxonomie virală elaborat de Comitetul Internațional pentru Taxonomie Virală (ICTV) este un sistem deschis, susceptibil de actualizări periodice. Totuși, plecând de la un număr limitat de criterii, sistemul reușește să definească categorii (taxoni) bine delimitate, cu semnificație clinică. În acest mod, clasificarea "viro-astronomică" este tot mai mult "viro-logică".

Taxoni

Pentru clasificarea tuturor virusurilor, unitățile taxonomice mari: familie, ordin, gen (tip) sunt bine conturate. Delimitarea fiecărui tip se face în funcție de proprietățile virionului: morfologie, proprietăți fizico-chimice, compoziție (acid nucleic, proteine, lipide, carbohidrați), organizarea genomului și strategia replicativă, antigenitate. Unitățile taxonomice mai mici - speciile și subspeciile - sunt mai puțin strict delimitate. Speciile rămân taxonii cu care se lucrează în mod curent, iar, pentru definirea lor, Baza de Date Universală a Virusurilor <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdB> consideră nu mai puțin de 2 600 de caractere cuprinse într-o lucrare ce numără 466 de pagini. Pentru specii, câteva caractere capătă importanță majoră și trebuie cunoscute de orice cercetător care lucrează în domeniu: detaliile privind izolarea tulpinilor (an, localitate, număr), detaliile privind depozitarea și pasajele de întreținere, antigenitatea și mai multe proprietăți bio-

logice pe care le vom detalia la fiecare specie. În acest mod se vor putea delimita în cadrul fiecărei specii: serogrupuri, tulpini, izolate sau clone.

Pornind de la simplu la complex, definim următoarele categorii taxonomice:

- *specia* - reprezintă o mulțime constituită din tulpini de virus care au în comun un set de proprietăți stabile care separă această mulțime de altele asemănătoare. În general, specia este rezultatul unei decizii subiective. Pentru virusurile ARN, cu mare variabilitate, se întrebuițează uneori și termenul de *quasispecii*, care reprezintă submulțimi caracterizate de identitate genomică. Fiecare quasispecie posedă o secvență genomică consens caracterizată pentru fiecare poziție din lanțul nucleotidic de bazele întâlnite cel mai frecvent. Tulpinile virale sunt constituite din progenii rezultați din replicarea unui singur izolat viral;

- *genul* - grupe de specii virale cu caracteristici comune și cu un ancestor comun (terminația latină: *virus*; exemplu: *Morbillivirus* = virus rujeolos);

- *familia* - grupe de genuri cu caractere comune în ceea ce privește morfologia virionilor, structura genomică și strategia replicării (terminația latină: *viridae*; exemplu: *Paramixoviridae*);

- *ordinul* - este un nou grup taxonomic care grupează familii cu strategie comună a replicării. La Congresul Internațional de Virusologie (Ierusalim, 1996) au fost recunoscute două ordine: *mononegavirale* (cu genom ARNs cu polaritate negativă) și *nidovirale* (fără anvelopă).

Taxonomia actuală utilizează următoarele criterii definitorii pentru clasificare:

1. Proprietățile virionului: talie, formă, simetrie, prezența anvelopei.

2. Proprietățile genomului: tipul de acid nucleic, numărul de spire (simplu sau dublu spiralat = ss/ds); linear sau circular (L, C), sensul de transcriere sau polaritatea, numărul de segmente, secvența de nucleotide.

3. Proprietățile proteinelor virale: număr, greutate moleculară, funcție, secvența de aminoacizi.

4. Replicarea virală: strategia replicării, a transcrierii, a traducerii, modificări posttraducere, asamblarea și eliberarea virionilor progeni.

5. Proprietățile fizico-chimice: stabilitate termică, rezistența la pH, radiații, detergenți, solvenți, ioni etc.

6. Proprietățile biologice: serologie, spectru de gazdă, tropism celular, vectori.

CLASIFICARE EPIDEMIOLOGICĂ

O clasificare foarte utilă pentru clinician folosește drept unic criteriu calea de transmitere a agentului etiologic viral. Următoarele categorii pot fi delimitate:

- Virusuri enterice - cu transmitere fecal-orală (exemplu, poliovirusuri).
- Virusuri respiratorii - cu transmitere aeriană (exemplu, virusuri gripale).
- Virusuri cu transmitere sexuală (exemplu, HIV).
- Virusuri transmise prin sânge (exemplu, virusul hepatitei B).
- Virusuri transmise de artropode (exemplu, arbovirusuri encefalitogene).
- Virusuri transmise vertical, materno-fetal (exemplu, virusul rujeolos, citomegalic etc.).

TABELUL 2.1

PRINCIPALELE RIBOVIRUSURI CU SEMNIFICAȚIE MEDICALĂ

Familia	Diametru (nm)	Simetria capsidei	Greutate moleculară genom	Număr proteine codificate	Număr segmente în genom	Număr nucleozide $\times 10^3$
Picornaviridae	22-30	Ic	2,5	4	1	6,6-8,4
Caliciviridae	35-40	Ic	2,6	2	1	8
Togaviridae	50-70	Ic	4	3	1	10
Flaviviridae	60-70	Ic	4	3	1	10
Bunyaviridae	75-80	H	6	3	3	13,5-21
Rhabdoviridae	50/350	H	3,5-4,6	5	1	13-16
Reoviridae	60-80	Ic	12-20	10-11	10-11	16-22
Coronaviridae	75-100	Ic	6-8	4-6	1	16-21
Arenaviridae	60/300	Ic	6	3	5	10-14
Filoviridae	80/800	Ic	8	6	1	
Orthomixoviridae	80-120	H	5	7-8	7-8	13,6
Paramixoviridae	120-140	H	5-7	6	1	16-20
Retroviridae	80-100	H	10-12	10	1 x 2	3,5-9

Abrevieri: Ic - simetrie icosaedrică; H - simetrie helicoidală. Greutatea moleculară a ARN viral exprimată în 10^6 Da.

Familii importante din punct de vedere medical. În prezent, ICTV recunoaște 61 familii de virusuri, din care 21 sunt patogene pentru om (tabelul 2.1 și tabelul 2.II).

Vom enumera numai familiile importante din punct de vedere medical:

RIBOVIRUSURI (fig. 2.1 și 2.2)

1. *Picornaviridae* grupează virusuri fără anvelopă, cu simetrie icosaedrică, diametrul virionului 27-30 nm, genom ss cu polaritate pozitivă și infecțios, spectru îngust de gazdă. Din această familie fac parte cinci genuri:

- Enterovirus (virusurile polio, Cocksackie și ECHO).
- Cardiovirus (virusul encefalomiocarditei).
- Rhinovirus (agenții guturaiului).
- Aphtovirus (virusurile febrei aftoase).
- Heparnavirus (virusul hepatitei A).

Genomul la picornavirusuri, deși variază ca dimensiune între 7,2 kb la rhinovirusuri și 8,5 kb la aphtovirusuri, prezintă câteva caractere comune:

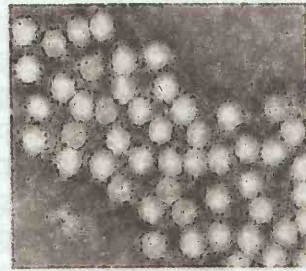
- o regiune lungă (0,6-1,2 kb), noncodantă, la capătul 5' al genomului, importantă pentru virulență și pentru replicare;
- o regiune scurtă (50-100 de nucleotide), noncodantă, la capătul 3', necesară pentru sinteza spirei negative complementare (unde se atașează așa numitul semnal de poliadenilare);
- restul genomului codifică o singură proteină, clivată ulterior în polipeptidele capsidei.



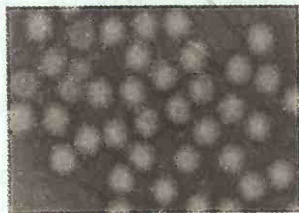
Coronaviridae (NS+)



Arenaviridae (S, ambi)



Picornaviridae (NS+)



Calciviridae (NS+)

RNA viruses Positive strand (+)

S=segmented NS=non-segmented

Ambi: part + and part -

100nm

Fig. 2.1. Imagini la microscopul electronic ale virionilor aparținând unor familii de ribovirusuri cu polaritate pozitivă a genomului. Familia arenaviridae are virioni cu genom segmentat și cu polaritate fie pozitivă, fie negativă (antimesaj).

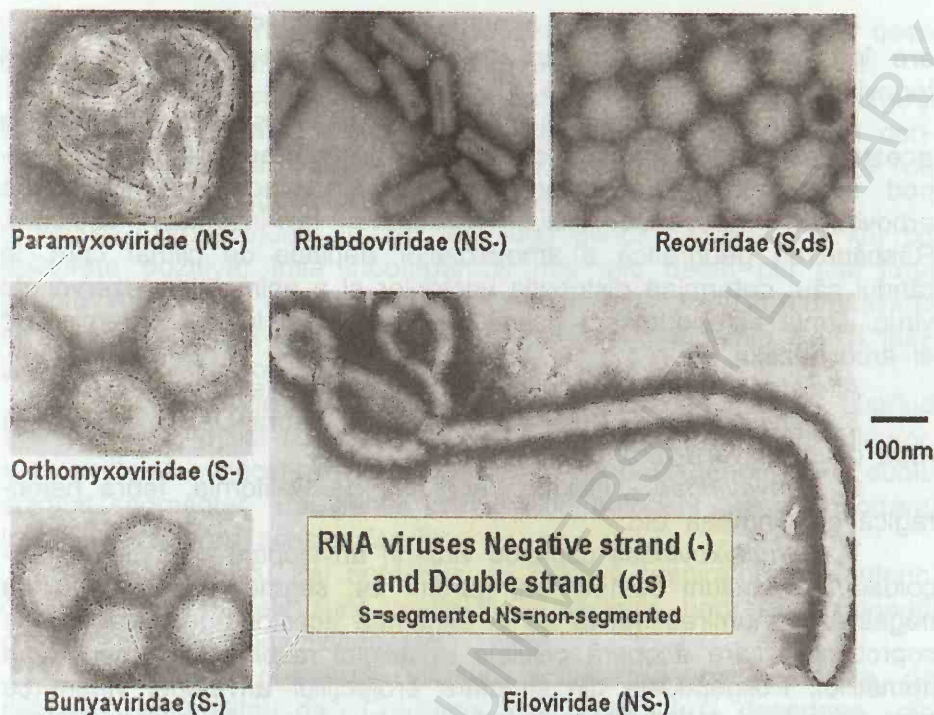


Fig. 2.2. Virioni din familii de ribovirusuri cu genom ARN cu polaritate negativă cu genom nesegmentat (NS) sau segmentat (ordinul mononegavirale).

2. *Caliciviridae* prezintă aceleași caractere ca picornavirusurile, cu excepția formei și taliei mai mari (35-40 nm). Exemple: agenții gastroenteritelor umane și patogeni asemănători la porci, câini, feline. Infecțiile la om afectează în special copiii și se transmit cu ușurință în colectivități. Alte virusuri ARN au fost izolate din epidemii de boală diareică acută (BDA): astrovirusuri, coronavirusuri și virusuri mici, rotunde, neclasificate: agentul Norwalk.

3. *Togaviridae* cuprinde virusuri anvelopate, cu simetrie icoaedrică, dimensiuni 60-70 nm, genom ss cu polaritate pozitivă și infecțios, spectru larg de gazdă (primate, alte mamifere, păsări și insecte). Toga-, flavi- și bunyaviridele alcătuiau în trecut grupul arbovirusurilor (*artropode borne viruses*). Familia togaviridae cuprinde 4 genuri:

- Alphavirus (virusurile encefalitelor ecvine de Est, Vest, Venezuela etc.).
- Rubivirus (virusul rubeolos).
- Pestivirus (virusul diareei bovine, *hog cholera virus*).
- Hepacivirus (virusul hepatitei C).

4. *Arteriviridae* (virusul arteritei ecvine), cu caractere intermediare între pești și flavivirusuri, este o familie recent desprinsă din togaviridae.

Arbovirusurile infectează mamifere și păsări și sunt menținute în aceste rezervoare animale de insecte hematofage. Vectorul artropod se infectează mușcând animalele în stadiu viremic. Multe arbovirusuri realizează cicluri replicative la insectele vectoare. Răspândirea geografică a arbovirusurilor depinde de climat care, la rândul său, determină distribuția vectorilor și a animalelor rezervor de virus. Omul este numai o gazdă accidentală în lanțul epidemiologic al arbovirusurilor.

Alte două familii desprinse din arbovirusuri sunt:

5. *Flaviviridae* - include febra galbenă, febra Denga, encefalita rusă de primavară-vară etc.

6. *Bunyaviridae* - include encefalita de California, febra hemoragică de Crimeea etc.

7. *Orthomixoviridae* cuprinde virusuri anvelopate cu simetrie helicoidală, dimensiuni 80-100 nm, genom ss, segmentat, cu polaritate negativă. Denumirea derivă de la afinitatea acestor agenți pentru glicoproteinele care acoperă celulele epitelului respirator și membrana hematiilor. Polipeptidele din structura proiecțiilor anvelopei virale (cu care virusul se atașează de substrat), ca și enzimele necesare pentru glicozilarea lor sunt virus codificate; lipidele și reziduurile glucidice din anvelopă sunt preluate din membrana celulei gazdă.

Această familie include trei genuri de virusuri gripale (influenzavirus A, B și C). Virusurile gripale A cuprind specii patogene pentru om, porc, cai, păsări etc., fiind responsabile de epidemiile de amploare; virusurile gripale B determină gripa sporadică (și, probabil, o complicație fatală rară: sindromul Reye).

8. *Paramixoviridae* sunt virusuri mai mari (100-150 nm), dar cu caractere asemănătoare ortomixovirusurilor. Esențial pentru delimitarea lor este genomul nesegmentat, ceea ce determină stabilitatea lor antigenică. Mulți agenți patogeni importanți pentru om sunt cuprinși în această familie:

- genul morbillivirus, cu virusul rujeolos;
- genul pneumovirus, cu virusul respirator sincițial;
- genul paramixovirus, cu virusul urlan și paramixovirusuri propriu-zise.

9. *Rhabdoviridae* sunt virusuri alungite, cu secțiune de glonț. În realitate sunt anvelopate, cu simetrie helicoidală, genom ss nesegmentat, cu polaritate negativă. Principalul patogen este virusul rabic, care se replică exclusiv citoplasmatic formând incluziile Babeș Negri și se eliberează din celule prin înmugurire la nivelul membranei celulei

infectate. Rhabdoviridele au un spectru de gazdă foarte divers, ceea ce le permite schimbarea cu ușurință a speciei gazdă infectate.

O familie desprinsă de rhabdoviride include agenții Marburg și Ebola, care determină febre hemoragice transmise la om prin contact personal fără vector intermediar. Numele propus este de *Filoviridae* și corespunde formei alungite a virionilor.

10. *Coronaviridae* au cel mai lung genom ARNss (30 kb) cu polaritate pozitivă, însă incomparabil mai mic decât cel mai lung genom ADN viral - virusul citomegalic cu 280 kb. Un coronavirus emergent important a determinat în 2002-2003 pandemia SARS (sindrom acut respirator sever).

11. *Reoviridae* (virusuri respiratorii, enterice, orfane) cuprind agenți grupați inițial cu virusurile ECHO (picornavirusuri) dar, ulterior, s-a constatat o deosebire esențială: prezența unui genom ARN dublu spiralat segmentat. Trei genuri care includ patogeni umani importanți intră în alcătuirea acestei familii:

- Reovirus, cu trei serotipuri cu tropism respirator sau enteric, dar nu numai. Unele sunt implicate în etiologia unor endocrinopatii cronice: diabet, hipotiroidism etc.

- Orbivirus grupează virusuri encefalitogene (encefalita de căpușe, encefalita de Colorado, de exemplu) desprinse din arbovirusuri.

- Rotavirus grupează virusuri care determină gastroenterite epidemice la nou-născuți și copii mici.

12. *Retroviridae* sunt virusuri anvelopate cu simetrie icosaedrică cu genom ARNss prezent în două copii identice de aproximativ 8 500 nucleotide și cu o enzimă care asigură o strategie particulară a replicării: reverstranscriptaza. În cursul replicării, genomul ARN retroviral este reverstranscris într-o secvență ADN care (după realizarea spirei complementare) se poate integra în genomul celulei gazdă prin secvențele terminale (LTR - *long terminal repeat*). În forma integrată (ADNc proviral) retrovirusurile pot rămâne latente până la intervenția unor cofactori externi (mitogeni, antigene, virusuri) care, promovând activarea limfocitelor dormante, reactivează și replicarea retrovirusurilor.

Trei subfamilii sunt grupate în familia retroviridae.

- *Oncovirinae* - respectiv, virusurile oncogene ARN la murine, păsări, bovine etc. De la om în această familie au fost incluse virusurile HTLV (*Human T-cell Leukemia Viruses I și II*);

- *Lentivirinae* - agenții unor afecțiuni lent degenerative ale SNC și virusul HIV - agentul etiologic al SIDA.

- *Spumavirinae* - agenți ai unor infecții persistente, asimptomatice.

DEZOXIRIBOVIRUSURI (fig. 2.3)

TABELUL 2.II

PRINCIPALELE DEZOXIRIBOVIRUSURI CU SEMNIFICAȚIE MEDICALĂ

Familia	Diametrul virionului (nm)	Număr spire ADN	Greutatea moleculară genom $\times 10^6 Da$	Număr proteine codificate	Conținut G+C%	Număr nucleozide kb/kbp
Parvoviridae	18-26	1	1,5-2,2	3-4	41-53	5
Hepadnaviridae	42	2	3,2	4		3,2
Papovaviridae	45-55	2	3-5	5-7	41-49	5-8
Adenoviridae	70-90	2	20-25	9-12	48-58	36-38
Herpesviridae	100-200	2	100-150	50-60	32-42	120-250
Poxviridae	350-450	2	160-200	peste 300	35-40	130-280

1. *Parvoviridae* sunt cele mai mici virusuri ADN care infectează omul (18-26 nm), neanvelopate, cu genom ss, conținând spira pozitivă sau negativă în virioni separați. Două genuri parazitează animalele homeoterme de la păsări la om: parvovirus și dependovirus. Al doilea gen ilustrează categoria particulară a virusurilor defective care reclamă coinfectia cu un virus helper (în acest caz, adenovirus sau herpesvirus) pentru o replicare productivă.

La om, acești agenți au fost implicați în crizele aplastice din anemiile drepanocitare ca urmare a infecției celulelor sușe din măduva hematogenă și în "boala a 5-a febrilă a copilăriei". Dependovirusurile par a inhiba oncogenitatea experimentală a virusurilor herpetice și adenovirusurilor.

2. *Papovaviridae* sunt virusuri neanvelopate, cu capsida icosaedrică, cu diametrul de 40-50 nm și cu genom ADNds circular. Spectrul de gazdă este îngust, deși agenții din această familie pot infecta o varietate de specii (păsări, rozătoare, primate). Infecția unor gazde distanțate filogenetic de gazda naturală relevă uneori proprietăți oncogene. Două subfamilii prezintă interes medical:

- *Polyomavirinae* - nume indicând capacitatea acestor virusuri de a determina tumori cu localizări multiple.

- *Papillomavirinae* - cuprinzând agenții verucilor sau papiloamelor cutanate sau mucoase. Papilomavirusurile umane sunt legate de dezvoltarea carcinomului de col uterin și a altor neoplazii intraepiteliale.

3. *Adenoviridae* cuprinde vechiul grup al agenților cu tropism adenofaringoconjunctival (APC), respectiv 46 de serotipuri care determină afecțiuni acute epidemice respiratorii, digestive, conjunctivale etc. Sunt virusuri neanvelopate, cu simetrie icosaedrică, diametrul 65-80

nm și genom ds circularizat prin intermediul unor proteine legate covalent de capetele ADN. Multe aspecte ale replicării genomului adenoviral au servit drept model pentru procese importante de biologie celulară: inițierea replicării ADN la eukariote, transportul și prelucrarea ARNm în cursul traducerii, transformarea celulară etc.

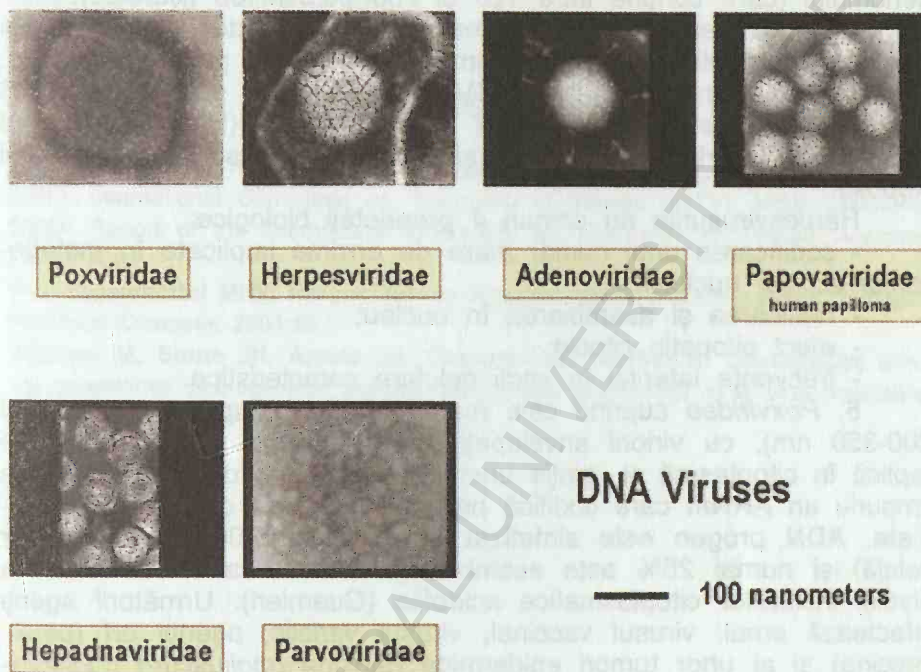


Fig. 2.3. Virionii celor 6 familii de deoxiribovirusuri importante pentru medicina umană.

4. *Hepadnaviridae* cuprind virusuri hepatitice (virusul hepatitei B la om), cu tropism exclusiv pentru hepatocit. Virionii sferici (42 nm în diametru) au genomul parțial ds, aproape circular. Câteva aspecte particularizează acești agenți:

- disproporția între sinteza materialului proteic al anvelopei și genom;
- mecanism neobișnuit de replicare, care include reverstranscrierea unui ARN viral mai mare decât cel genomic utilizând o amorsă ("primer") virus codificată;
- spectru îngust de gazdă, tropism limitat la hepatocite;
- frecvența infecțiilor persistente cu producție continuă (ani de zile) de virus infectant.

Hepadnavirusurile par a fi înrudite cu retrovirusurile, având nu numai gene cu funcții comune, dar și omologii în secvențele genomice (pentru reverstranscriptaza virală).

5. *Herpesviridae* grupează virusuri complexe, cu anvelopă și alte învelișuri pericapsidare suplimentare. Diametrul este variabil: 120-300 nm. Simetria capsidului este icosaedrică, cu 162 de capsomere, iar genomul linear, dublu spiralat. Între diferiții membri ai acestei familii deosebit de heteromorfe există deosebiri în structura și dimensiunea genomului (care conține între 120 și 230 perechi de kilobaze).

Din cele peste 100 de herpesvirusuri izolate de la multe specii poikilo și homeoterme, opt sunt importante pentru patologia umană: virusul herpes simplex 1 și 2 (HSV 1 și 2), virusul citomegalic (HH3 - *human herpesvirus* 3), virusul varicela-zoster (HHV 4), virusul Epstein-Barr (HH5) și HH6, 7 și HH8 (virus asociat sarcomului Kaposi).

Herpesvirusurile au comun 4 proprietăți biologice:

- codificarea unui număr mare de enzime implicate în metabolismul acizilor nucleici;
- replicarea și asamblarea în nucleu;
- efect citopatic citocid;
- frecvența latenței în sedii celulare caracteristice.

6. *Poxviridae* cuprind cele mai mari virusuri animale (diametru 200-350 nm), cu virioni anvelopați, paralelipipedici. Poxvirusurile se replică în citoplasmă și, grație unei transcriptaze proprii, pot sintetiza timpuriu un ARNm care codifică proteine necesare decapsidării complete. ADN progen este sintetizat în exces (20 000 de copii per celulă) și numai 25% este asamblat și eliberat ca virion matur la nivelul incluziilor citoplasmice acidofile (Guarnieri). Următorii agenți infectează omul: virusul vaccinal, virusul variolic, agenții orf (paravaccina) și ai unor tumori epidermice benigne (*molluscum contagiosum*).

AGENȚI NECLASIFICAȚI

Descoperirea continuă de noi agenți virali, unii cu particularități genomice nedescifrate creează probleme sistemisticii actuale. Între aceștia menționăm agenții encefalopatiilor subacute spongiforme (prionii) sau vechiul grup CHINA virus (pentru "*chronic infections neuropathic agents*"), agentul hepatitei delta precum și noii agenți din grupul hepatitelor nonA nonB transmise prin transfuzii.

Sinteză

Pornind de la simplu la complex, taxonomia virală utilizează următoarele categorii: specii, genuri, familii, ordine. Proprietățile virionului, ale genomului și strategia replicării sunt esențiale pentru clasificare. Virusurile conțin fie ARN (ribovirusuri), fie ADN (dezoxiribovirusuri), dar nu ambele. Acidul nucleic viral poate fi simplu sau

dublu spiralat, linear sau circular, segmentat sau nu. ARNss poate avea polaritate pozitivă (este infecțios și servește ca ARNm) sau negativă (antimesaj). Clasificarea epidemiologică optează pentru criteriul căii de transmitere: virusuri enterice, respiratorii, cu transmitere sexuală, virusuri cu transmitere prin sânge, transmise prin vectori și transmise vertical (de la mamă la făt).

BIBLIOGRAFIE

Van Regenmortel HV, Bishop DHL, Van Regenmortel MH, Fauquet Claude M (eds.). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 2004.

Van Regenmortel MHV. Perspectives on binomial names of virus species. *Emerging Infectious Diseases* 2004;10:1.

Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 2006;439:344-348.

REPLICAREA VIRUSURILOR

De reținut:

Virionul reprezintă forma inertă a virusurilor; existența și multiplicarea virusurilor nu poate fi concepută decât în relație cu celula gazdă. Ciclul de multiplicare viral cuprinde faza de eclipsă (adsorbție, internalizare, decapsidare); faza de creștere lineară (sinteza proteinelor virale și a genomurilor progene) și faza de platou (maturare, asamblare, eliberare). Substanțe antivirale specifice pentru fiecare etapă a ciclului replicativ au fost sintetizate.

Istoric. Purificarea virusurilor și evidențierea compoziției lor simple, numai proteine și acid nucleic, au fost realizate încă la începutul anilor '50. Markham și Smith (1949) au demonstrat că numai particulele conținând acid nucleic sunt infectante, iar Hershey și Chase (1952) au relevat funcția independentă a proteinelor (marcate cu ^{32}S) și a acizilor nucleici (marcați cu ^{35}P). După infecție, proteinele virale par a nu mai fi esențiale pentru replicare, acidul nucleic fiind purtătorul eredității virale. În alt experiment clasic, Fraenkel-Conrat și Singer (1957) au confirmat prin hibridizare rolul ereditar al ARN viral.

CICLUL REPLICATIV VIRAL

Ciclul replicativ viral a fost elucidat inițial la fagi, dar desfășurarea evenimentelor în cazul virusurilor animale este identică. Natura și cinetica procesului sunt evidențiate de curba de creștere de o generație (fig. 3.1), adică în condițiile unui raport virus/celulă apropiat de unitate. În cazul unei multiplicități de infecție mari (raport virus/celulă excesiv) fenomenele se complică. Astfel, uneori putem înregistra distrucția rapidă a celulei gazdă prin efectul litic pe care numeroasele particule virale adsorbite la celulă îl exercită asupra membranei celulare (*lysis from without*). Alteori se remarcă sinteza de virioni cu genom defectiv, rezultând titruri infectante mici.

Curba de creștere de o generație cuprinde 3 faze: de eclipsă, de creștere lineară și de platou. Faza de eclipsă durează primele

10-20 de minute imediat după infecție și este un interval în care virusul extracelular și cel intracelular din sistem nu pot fi detectate. Faza de creștere lineară debutează inițial intracelular și are o pantă diferită în funcție de particularitățile sistemului virus - celulă gazdă. În orice caz, evoluția lineară a apariției virionilor intracelulari sugerează că aceștia din urmă sunt rezultatul asamblării din părți componente și nu urmarea fisiunii binare. Faza de platou este dependentă ca durată și aspect al pantei de mecanismul eliberării virionilor progeneri din celula gazdă: prin liză sau prin înmugurire (vezi mai jos). Succesiunea evenimentelor ciclului replicativ a fost disecată consecutiv aplicării unor tehnici biochimice și folosirii trasorilor radioactivi. De asemenea, utilizarea unor inhibitori ai sintezei ADN (iod dezoxiuridina), ai sintezei ARN sau ai transcrierii (actinomicina), ai traducerii (puromicina și cicloheximida) a reprezentat un instrument ideal pentru studiu. Etapele fiecărei faze menționate mai sus sunt practic dificil de separat. De altfel, sincronizarea unor cicluri infecțioase paralele nici nu are loc în realitate.

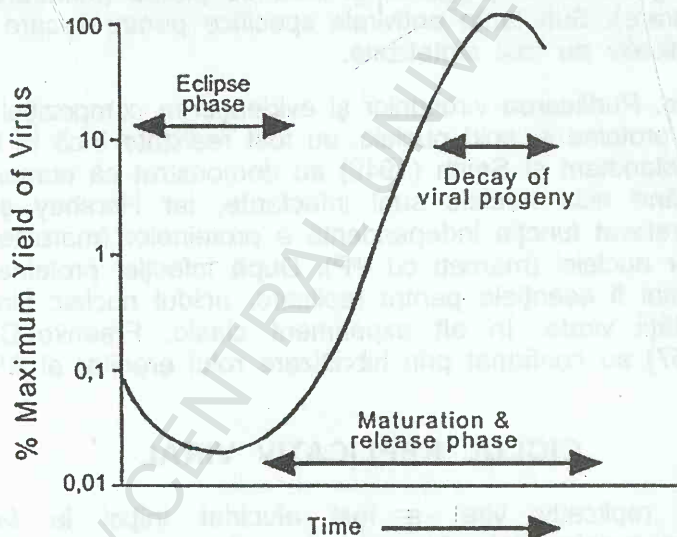


Fig. 3.1. Producția de virus în raport cu fazele ciclului replicativ: în faza de eclipsă - virus extracelular nedetectabil; în faza logaritmică (*maturation phase*) - escaladarea producției de virus extracelular; în faza de platou - scăderea treptată a producției odată cu epuizarea substratului celular.

Pentru rațiuni didactice, descriem în fiecare fază trei etape (suprapuse uneori):

- faza de eclipsă: adsorbția, internalizarea și decapsidarea;
- faza de creștere lineară: sinteza proteinelor timpurii, transcrierea genomurilor progeneri pe matrița genomului parental și sinteza proteinelor tardive (structurale);

- faza de platou: maturarea, asamblarea și eliberarea.

Adsorbția. Atașarea virionilor la membrana celulei gazdă este urmarea coliziunii virion - celulă rezultate din mișcarea browniană. Procesul este independent de temperatură și de aportul energetic exogen. Totuși, adsorbția fermă este condiționată de prezența unor receptori specifici. Lipsa receptorilor explică rezistența celulelor de anumite specii la infecția virală.

Receptorii virali au și alte funcții în economia celulei (receptori hormonal, farmacologici, imunologici, neuroreceptori etc.). O modalitate frecventă de interacțiune virus - receptor este atașarea unor proiecții ale ambelor componente. De exemplu, virusul Epstein-Barr are o glicoproteină externă - gp 350/220 - care leagă în raport 1/1 o structură a limfocitului B. Este aceeași structură (CD21) care servește și pentru cuplarea unui fragment al celei de-a treia componente a complementului C3d. Virusul este ferm atașat de celulă chiar la o distanță de 50 nm de membrana acesteia. Mai mult, atașarea virusului de celulă determină un semnal care promovează transformarea blastică a limfocitului B. Este clar că virusul s-a adaptat la utilizarea unui receptor celular și mimează structura și funcția unui ligand natural.

Receptorii virali pot fi (tabelul 3.1):

- **de înaltă afinitate** - au dublă funcție:

1. mediază adsorbția virală;
2. induc modificări conformaționale în virionii adsorbiți, modificări esențiale pentru pașii următori ai ciclului replicativ (internalizare, decapsidare ș.a.);

TABELUL 3.1

EXEMPLE DE RECEPTORI SPECIFICI ANUMITOR VIRUSURI

Receptori	Virus
pentru acetilcholină	Virusul rabic
pentru complement (C3d) - CD21	Virusul Epstein-Barr
pentru FGF*	Virusul herpes simplex
pentru antigene CMH clasa I	Virusul citomegalic
CD4	HIV
molecule HLA	Picornavirusuri
molecule adeziune ICAM-1	Rhinovirusuri
pentru EGF**	Virusul vaccinal
adrenergici	Reovirusuri

*FGF - fibroblast growth factor; **EGF - epidermal growth factor.

- **de joasă afinitate** (coreceptori) - mediază numai adsorbția (reversibilă, uneori) și sunt funcționali în măsura în care cuplarea lor

se asociază cu schimbări ale mediului extracelular (exemplu, scăderea pH), care determină modificări conformaționale în structura 3D (tridimensională) a virionului sau a membranei celulare. Unele virusuri au tropism dublu - virusuri care prin utilizarea preferențială a unora sau altora dintre coreceptori pot iniția infecția în diferite tipuri de celule diferențiate (exemplu, tulpini HIV macrofagotrope și/sau limfotrope).

O altă variantă de adsorbție este modelul creastă-canion (*ridge/groove*) evidențiat la rhinovirusuri. Progrese remarcabile au fost recent realizate în lămurirea receptorilor și coreceptorilor virusului imunodeficienței dobândite (HIV - agentul SIDA). Pe lângă receptorul principal constituit de molecula CD4 (situat la suprafața limfocitelor T helper, a macrofagelor și a câtorva celule prezentatoare de antigen), HIV mai reclamă prezența unor coreceptori. Este similar cu ceea ce se întâmplă în cazul corespondenței care, pentru a ajunge la destinatar, are nevoie în afara adresei și de codul poștal. Codul poștal este reprezentat de coreceptori și asigură un tropism mai selectiv al tulpinilor virale pentru anumite celule. Analiza structurală de înaltă rezoluție a receptorului celular CD4 indică o buclă extracelulară care cuplează cu mare afinitate un "canion" de la suprafața virusului realizat de glicoproteina gp120. Interesul considerabil pentru utilizarea unor forme solubile ale proteinei CD4 drept capcane pentru virus a fost temperat de rezultate recente care arată lipsa de afinitate a unor izolate virale pentru analogii solubili CD4. În fapt, substituția unică a unui aminoacid în gp120 este suficientă pentru alterarea completă a tropismului HIV.

Trebuie menționat că infecția unor celule cu un prim virus poate crea receptori noi pentru infecții consecutive. Este cazul virusului citomegalic care dezvoltă receptori Fc prin care complexe virus-anticorpi pot accede în celule.

Internalizarea. Virusurile anvelopate (retro, paramixo, herpesvirusurile etc.) pot penetra intracelular prin două mecanisme distincte: (1) fuziunea directă a anvelopei cu membrana celulară sau (2) viropexie - endocitoza virionilor. Alegerea unui mecanism sau altul depinde de starea celulei gazdă. De exemplu, virusul Epstein-Barr pătrunde prin fuziune în limfoblastele B maligne (datorită anomaliilor citoskeletonului acestor celule care nu endocitează) sau prin fuziune ori viropexie în limfocitele B normale. Substanțe care interferează endocitoza, cum sunt antagoniștii de calmodulină, pot inhiba replicarea EBV încă în acest stadiu timpuriu.

Virusurile neanvelopate (picorna, adeno etc.) sunt internalizate prin viropexie în vezicule cu pereți subțiri nearmate de clathrină. Endosomul celulelor care au endocitat este rapid acidifiat. Cele mai multe virusuri care sunt internalizate prin viropexie reclamă expunerea la pH acid pentru continuarea ciclului replicativ. În fine, alte virusuri penetrează fie prin fuziune, fie prin endocitoză. Virusul herpes sim-

plex poate să-și fuzioneze anvelopa la nivelul membranei celulare sau să fie inițial pinocitat și să realizeze fuziunea după endocitoză în pinosom. Virusurile herpetice au o penetrare independentă de pH.

Decapsidarea. Semnifică separarea fizică a acidului nucleic viral de învelișurile proteice.

Penetrarea și decapsidarea sunt evenimente simultane în cazul unor virusuri sau succesive în cazul altora. Cele trei etape: adsorbția, penetrarea și decapsidarea determină pierderea pasageră a infectivității, fiind desemnate împreună ca faza de eclipsă.

Urmează faza de creștere lineară, care include următoarele etape:

Sinteza proteinelor timpurii nonstructurale care participă la producția acizilor nucleici virali progeni: aceste proteine au funcție:

- enzimatică, pentru sinteza ARN sau ADN viral;
- inhibitorie, pentru sinteza ADN, ARN și proteinelor celulei gazdă;
- în edificarea morfologică a incluziilor virale.

Sinteza diferitelor specii de ARN mesager pe matricea genomului viral parental cu ajutorul polimerazelor incluse în structura virionilor (pentru unele virusuri) sau a polimerazelor furnizate de celule infectate (pentru altele);

Sinteza proteinelor tardive structurale prin traducerea ARNm din etapa anterioară. Proteinele tardive sunt, în primul rând, componente ale virionului, dar pot avea funcție enzimatică sau pot participa la morfogeneza virionilor maturi. Speciile de ARNm care servesc drept matricea proteinelor tardive sunt diferite de matricea proteinelor timpurii. Mai mult, ARNm ai proteinelor tardive sunt transcriși de pe genomul progen și, pentru că întotdeauna există mult mai mulți progeni decât parentali, moleculele de ARNm tardiv sunt în exces. Disproporția dintre materialul genomic și cel proteic este frecvent întâlnită în replicarea virală.

Durata fazei de creștere lineară este limitată de capacitatea celulei gazdă de a furniza energie sintezei macromoleculare. Infecția litică interferează invariabil cu funcții vitale ale celulei gazdă determinând moartea acesteia.

Faza finală a ciclului infecțios este reprezentată de eliberarea virionilor progeni. În cazul virusurilor neanvelopate și al poxvirusurilor celulele infectate se dezagregă eliberând rapid virionii nou sintetizați. În cazul virusurilor anvelopate această fază conține mai multe etape:

- *maturarea* componentelor virionale;
- *asamblarea* lor la nivelul membranei celulare sau a membranelor care mărginesc vacuolele intracitoplasmatic;
- *eliberarea* prin înmugurire sau liză celulară a virionilor progeni.

În cazul virusurilor anvelopate, cantitatea de virus extracelular întrece pe cea a virusului asociat celulei, invers decât în cazul virusurilor neanvelopate.

Durata ciclului de replicare este variabilă în funcție de virus (tabelul 3.II).

TABELUL 3.II

DURATA APROXIMATIVĂ A FAZEI DE ECLIPSĂ ȘI A ÎNTREGULUI CICLU DE MULTIPLICARE

<i>Virus</i>	<i>Durata eclipsei (ore)</i>	<i>Durata totală (ore)</i>
Vaccinia	4	24
Adeno	10	24
Polio	2	8
Gripal	3-5	18-36

Strategia expresiei genelor virale. Indiferent de organizarea genomului, virusul trebuie să prezinte celulei gazdă specii de ARNm recunoscute ca atare și traduse de mecanismele de sinteză proteică proprii celulei eukariote. Anumite constrângeri trebuie eludate, pentru ca atât virusurile ARN, cât și cele ADN să se poată replica. De exemplu, cele mai multe virusuri trebuie să-și sintetizeze propriile enzime pentru a genera în final ARNm. De asemenea, eukariotele traduc numai mesaje monocistronice, ceea ce impune sinteza de specii de ARNm separate pentru fiecare proteină virală sau sinteza unor precursori care urmează a fi ulterior clivați de proteaze celulare sau virale. În fine, virusurile trebuie să dezvolte strategii replicative care să le confere avantaje asupra sintezei proteinelor celulare sau să abolească sinteza ultimelor.

În acord cu Baltimore, virusurile se împart din punct de vedere replicativ în șase clase:

- I. virusuri ARNss cu polaritate pozitivă - exemplu, picornavirusuri,
- II. virusuri ARNss cu polaritate pozitivă cu porțiuni genomice diferite funcțional - exemplu, togavirusuri,
- III. virusuri ARNss cu polaritate negativă - ortho și paramixovirusuri etc.,
- IV. virusuri ARNss care se replică prin reverstranscriere - retrovirusuri,
- V. virusuri ARNds - exemplu, reovirusuri,
- VI. virusuri ADN - exemplu, herpesvirusuri.

Genomul picornavirusurilor este bifuncțional: 1. servește ca ARNm pentru sinteza unui precursor poliproteic care ulterior este clivat și 2. servește ca matrice pentru sinteza spirei complementare negative care este matrice, la rândul ei, pentru sinteza progenilor ARNss (+).

Genomul togavirusurilor diferă de cel al picornavirusurilor prin faptul că numai o porțiune a lui este tradusă inițial. Proteinele sintetizate transcriu apoi întreg genomul într-o spirală complementară care servește drept matriță pentru specii diferite de ARN (+), și anume:

- cu lungimea întregului genom reprezentând genomul progen,
- cu lungimea genomului netradus inițial reprezentând ARNm pentru proteinele structurale.

Orthomixo-, paramixo-, bunya-, arena- și rhabdovirusurile alcătuiesc grupul virusurilor ARNss cu polaritate negativă (ordinul Mononegavirale). Caracteristic pentru ele este că același genom servește succesiv ca matriță pentru transcrierea spirei complementare pozitive și pentru sinteza spirei negative (sinteza ARN progen). Ca urmare, apar trei elemente definitorii pentru aceste virusuri: (1) virionii conțin o transcriptază; (2) ARN extras din virion este neinfecțant și (3) ARNm conține multiple semnale de clivare care permit transcrierea mai multor proteine de pe aceeași regiune a ARN genomic. Paradoxal, deși sintetizate pe același ARN genomic, ARNm și ARN (+) care va servi drept matriță pentru ARN progen diferă între ele. O excepție notabilă în acest grup este cazul bunyavirusurilor cu genom trifragmentat și funcțional ambisens, în care atât spira negativă, genomică, cât și cea pozitivă, complementară, pot acționa ca ARNm.

Retrovirusurile au un genom cu o singură funcție: matriță pentru sinteza ADN proviral reverstranscris (ADNc). ADNds proviral se integrează în genomul celulei gazdă. Fragmentul integrat servește pentru transcrierea ARN genomic cu lungime globală și pentru transcrierea ARNm cu lungime parțială care servește la sinteza precursorilor proteinelor structurale și reglatorii.

Reovirusurile au genom ARNds segmentat. Pe această matriță se sintetizează ARNm care are două destinații:

- este tradus în proteine virale;
- este asamblat într-un precursor care grupează toate fragmentele genomice și care servește pentru sinteza spirelor complementare.

Virusurile cu genom ADN se replică în nucleu (cu excepția poxvirusurilor) și pot utiliza enzimele de transcriere ale gazdei pentru a-și genera ARNm. Ca urmare, ADN viral este infecțios, iar transcrierea se desfășoară în mai multe cicluri din care numai ultimul furnizează proteinele structurale în care se assemblează virionii progeneri.

Grupul mare al virusurilor ADN conține și excepții interesante de la mecanismul de replicare schițat, ca de exemplu:

- parvovirusurile defective, care se replică numai asistate de herpes- sau adenovirusuri;
- hepadnavirusurile, care conțin enzime de întregire a genomului circular parțial și reverstranscriptaza etc.

Strategia eliberării virusurilor din celula infectată. Faza finală a maturării particulelor virale este uneori complicată de sinteza disproporționată a componentelor genomice și proteice. Consecințele pot fi uneori importante pentru că permit unor virusuri să determine infecții latente (herpes) sau cronice (hepadnavirusuri) ca să nu menționăm decât alternativele cele mai pregnante.

Trei mecanisme de eliberare pot fi delimitate:

- asamblarea intracitoplasmică și eliberarea prin citoliză (picornavirusuri);

- asamblare la nivelul membranei celulare și eliberare prin "înmugurire" - cazul virusurilor ARNss cu polaritate negativă și al retrovirusurilor;

- asamblare în nucleu și eliberare la nivelul sistemelor membranale - intracelulare - herpesvirusuri.

În ultimele două grupuri este semnificativă includerea în particula virală matură a unor structuri codificate de gazdă (în special din membrana celulară) care pot fi relevante imunologic.

Sintează

Cunoașterea ciclului replicativ și a strategiilor de multiplicare și eliberare oferă baza științifică a tentativelor de terapie antivirală. Substanțele antivirale sunt cu atât mai eficiente, cu cât interferează etape mai timpurii ale ciclului replicativ. Descoperirea noilor virusuri cu tropism foarte selectiv pentru celule înalt specializate, cum ar fi HIV pentru limfocitul T helper sau virusul herpes 6 pentru limfocitul B, sugerează că noi strategii pot fi imaginate și că inventarul virusurilor animale sau chiar umane nu este încă încheiat.

BIBLIOGRAFIE

Baltimore D. The expression of animal virus genomes. Bacteriol. Rev. 1971;35:235-241.

White JM, Littman DR. Viral receptors of the immunoglobulin superfamily, Cell 1989;56:725-728.

GENETICA VIRUSURILOR ANIMALE

De reținut:

Virusurile sunt segmente încapsidate de material genomic (ARN sau ADN). Variabilitatea este o proprietate importantă a replicării virale care rezultă din mutații sau recombinări. Frecvența mutațiilor este mai mare la virusurile ARN (10^{-4}) decât la cele ADN (10^{-6}), lucru explicabil prin absența mecanismelor de corecție a erorilor de transcriere "proof reading mechanisms", în cazul polimerazelor ARN.

TIPURI DE MUTANTE VIRALE

Structural, sunt două categorii majore de mutații:

- **punctiforme** - urmare a schimbării unei baze din codon;
- **prin deleție** - în care transcrierea omite sau "sare" un segment din matricea pe care genomul progen se sintetizează.

Funcțional, mutațiile sunt foarte diverse. Iată câteva exemple:

- **mutații condițional letale**, care se multiplică numai în anumite condiții selective. De exemplu, mutante **reci**, care se replică numai la temperatura suboptimală de 32°C , sau mutante **calde**, care se replică la temperatura supraoptimală de 39°C și nu la cea fiziologică pentru mamifere (37°C). O altă clasă de mutații condițional letale este reprezentată de mutantele dependente de gazdă care se replică numai în celulele unei anumite specii.

Mutațiile condițional letale dependente de gazdă au fost studiate intens în sistemul bacteriofag-bacterie. De regulă, ele sunt urmarea înlocuirii unui codon care specifică un aminoacid cu un codon stop UAG, UAA, UGA, codon care întrerupe lanțul proteic sintetizat. Adesea, proteina "truncată" este nefuncțională. În funcție de codonul stop introdus mutantele se numesc amber-UAG; ocre-UAA; opal. Alte mutante virale funcționale cu aplicație practică în selecție și bioinginerie sunt:

- mutantele cu dimensiuni ale plajelor mai mici sau mai mari decât cele uzuale;

- mutantele atenuate utilizate în vaccinurile vii atenuate;
- mutantele rezistente la anumite medicamente antivirale;
- mutantele cu deficit enzimatic.

Dimensiunea comparativă a genomurilor virale în raport cu alte organisme, precum și stabilitatea relativă a genomului sunt sintetizate în tabelele 4.I și 4.II.

TABELUL 4.I

STRUCTURA ESTIMATĂ A CĂTORVA GENOMURI

Organism	Număr gene	Număr nucleotide	Anul cartografierii
Virus	3-200	10^5	1990
Bacterie	4 000	10^6	1995
Fungi	7 000	2×10^6	2000
Om	$<4 \times 10^4$	10^9	2002

Interacțiuni genetice între virusuri. Infecția simultană a unei singure celule cu două sau mai multe particule virale cu genom similar, dar nu identic, este un eveniment frecvent. Ca urmare, progenii rezultați sunt hibrizi ai unor parentali quasiidentici produși prin interacțiuni genetice. Din aceste interacțiuni pot rezulta mai multe evenimente genetice:

- recombinația unor porțiuni genomice care poate conduce la complementare,
- reasortarea unor fragmente genomice preexistente (în cazul virusurilor cu genom fragmentat, ca, de exemplu: virusurile gripale, rotavirusuri etc.),
- reactivarea,
- amestecul fenotipic,
- mascarea fenotipică.

TABELUL 4.II

RATA DE MUTAȚII LA CÂTEVA GENOMURI

1/100	Retrovirusuri
1/1 000	Hepadnavirusuri
1/10 000	Ribovirusuri
1/100 000	Dezoxiribovirusuri
10^{-9}	Genom uman

Complementarea este un fenomen ilustrat de următorul exemplu: două mutante calde rezultate din alterări în zone distincte ale

genomului se suplează reciproc, dând progeneri care cresc la temperatura fiziologică, dar nu la cea supraoptimală.

Reactivarea este caracteristică virusurilor cu genom ARN sau ADN dublu spiralat. Iradierea cu ultraviolete a acestor virusuri le inactivează capacitatea replicativă (infectivitatea) prin formarea de legături covalente între baze pirimidinice adiacente. Totuși, la multiplicități mari de infecție (inocule conținând sute de mii de particule inactivate prin ultraviolete) se produce cooperarea între virionii lezați în zone diverse ale genomului și infectivitatea sporește brusc. Acest fenomen s-a numit **reactivare prin multiplicitate**.

GENETICĂ MOLECULARĂ

Analiza fenotipică a populațiilor virale poate discrimina mutante naturale spontan apărute. Utilizarea mutagenilor sau a medicamentelor antivirale adaugă însă noi variante virale determinate de substituții, deleții și recombinări. Există astfel date asupra unui spectru larg de variante care ajută la construirea unor hărți ale genomurilor virale. Au fost publicate hărți obținute prin recombinări, prin reasortări, prin clivarea genomului cu enzime de restricție sau prin hibridizări etc.

Interacțiuni nongenetice între virusuri. Particularitățile de asamblare ale virionilor din unități componente conduc frecvent la apariția unor populații virale distincte de parentali, care nu sunt rezultatul unor modificări genomice. Între acestea menționăm: heterozigotismul, amestecul fenotipic, interferența și supresia fenotipului mutant.

Heterozigotismul rezultă din încorporarea mai multor copii genomice într-un singur virion. Acest proces contribuie la complexitatea populației virale.

Amestecul fenotipic apare în urma unor infecții mixte din care rezultă progeneri care înglobează în capsidă proteine provenind de la ambii parentali, fără a se înregistra modificări genomice.

Interferența, în sensul rezistenței la superinfecție, poate fi omoloagă sau heteroloagă. Interferența omoloagă este urmarea coinfecției cu particule interferent defective, iar interferența heteroloagă presupune existența unor receptori comuni.

Supresia fenotipului mutant poate fi rezultatul unor mutații secundare, care determină reversia la fenotipul sălbatic, sau poate fi consecința unor modificări în celula gazdă. Acest din urmă fenomen este nongenetic din punct de vedere al genomului viral.

Reversia la fenotipul sălbatic este însă o modificare a genomului viral cu consecințe practice dintre cele mai importante. De exemplu, mutante atenuate incluse în vaccin pot redobândi caractere de virulență. Reversia apare prin mecanisme multiple:

- **reversia adevărată** - sau refacerea mutației care a contribuit la modificarea fenotipului sălbatic;

- **reversia compensatorie** - prin mutații secundare intragenice care corectează mutațiile primare;

- **reversia extragenică** - prin mutații compensatorii în alte gene virale sau celulare.

- **amestecul fenotipic și mascarea fenotipică** sunt cazuri particulare de complementare. În primul caz, două serotipuri apropiate (de exemplu, polio 1 și 3) infectează aceeași celulă, rezultând hibrizi cu capsidă mixtă, care conțin determinanți ai ambilor parentali. În al doilea caz, virusuri complet neînrudite infectează aceeași celulă, dând naștere unor progeni în care genomul unuia este mascat în capsida celuilalt.

PARTICULE INTERFERENT DEFECTIVE (PID)

În 1952, von Magnus a observat că pasaje succesive ale virusului gripal pe oul de găină embrionat, efectuate cu inocule concentrate, determină, progresiv, scăderea de mii de ori a concentrației virusului cultivat. Ulterior, acest fenomen a fost explicat prin apariția unor progeni defectivi care au următoarele proprietăți:

- conțin proteine capsidare normale,
- conțin numai o parte a genomului standard,
- se replică numai în condițiile coinfecției cu progenii care conțin genomul integru (progenii standard).

Coinfecția particule standard - PID conduce la trei fenomene:

- îmbogățirea treptată a stocului de virus cultivat în PID (în fapt, sărăcirea infectivității, care este atributul particulelor standard);
- interferența cu replicarea altor tulpini omoloage;
- reproducerea mai pregnantă a unor fenomene asociate infecției virale ca: inhibiția funcțiilor celulei infectate și transformarea celulară.

Condițiile care favorizează producția de PID sunt inoculele foarte concentrate sau aportul continuu în sistemul virus-gazdă de celule susceptibile, neinfectate. PID contribuie la instalarea fenomenului de persistență virală, la apariția unor mutante deletate sau la protejarea replicării unor virusuri defective. În încercările de izolare a virusurilor care reclamă câteva pasaje oarbe se obține tocmai epurarea stocului de virus de particulele defective.

Premiul Nobel pentru Medicină din 2006, acordat geneticienilor Andrew Fire și Craig Milo, își are originea în studiile anilor '70 asupra PID. Cei doi au descoperit mecanismul interferenței ARN (RNAi). RNAi este un fenomen comun la plante și animale prin care se asigură reglarea expresiei unor gene datorită inhibiției specifice care rezultă din formarea unui ARNds din ARN mesager și ARN interfe-

rent. RNAi protejează genomul polikariotelor de infecții virale persistente sau de contaminarea cu transposomi. Descoperirea are perspective de a fi aplicată în clinică în terapia genică a cancerului și a unor viroze.

EVOLUȚIA VIRUSURILOR

Dezvoltarea tehnicilor de secvențiere genomică și a procedeeelor caracteristice bioingineriei au adus o perspectivă nouă asupra relațiilor dintre diferitele tulpini ale unei specii sau dintre speciile aceleiași gen.

De exemplu, virusurile gripale pot evolua prin două mecanisme:

- **alunecarea antigenică**, determinată de modificări minore ale glicoproteinelor anvelopei virale care aduc totuși un avantaj selectiv tulpinilor care infectează o populație imună;

- **comutarea antigenică**, determinată de reasortări între segmente genomice. Noi variante antigenice pot fi generate când genele pentru hemaglutinină sau pentru neuraminidază de la virusurile gripale ale unor specii de păsări sau mamifere sunt introduse în setul genetic al virusurilor gripale umane. Gena H3 (hemaglutinină) a tulpinii A Hong Kong, care a erupt în 1968, a derivat de la tulpini ecvine sau aviare. Afectarea majoră a antigenicității tulpinilor apărute prin reasortarea genelor explică patogenitatea lor excesivă și extinderea pandemică a epidemiilor.

O variabilitate și mai pronunțată au tulpinile de virus al imuno-deficienței umane - HIV 1 - în care caz a fost introdus termenul de *quasispecii*, adică de populații virale foarte înrudite, dar cu secvențe genomice distincte. Considerând un singur bolnav de la care, în cursul afecțiunii, se izolează mai multe specimene virale, acestea diferă între ele atât antigenic, cât și în privința unor proprietăți biologice: efect citopatic, virulență, antigenicitate etc.

ORIGINEA VIRUSURILOR

Între microorganismele prokariote cu potențial patogen, virusurile constituie o entitate aparte de paraziți obligat intracelulari. Ei există numai pasager în afara celulei gazdă și depind pentru multiplicare de suportul energetic (mitocondriile) și de mecanismele de sinteză proteică (ribozomii) ale celulei gazdă. Virusurile posedă un genom propriu (ADN sau ARN) care codifică componentele structurale. Particula virală sau virionul se assemblează în celulă din unitățile componente (adesea repetitive).

Există mai multe teorii care își propun să explice originea virusurilor:

- **teoria evoluției regresive** - susține că virusurile sunt forme degenerare de viață care au păstrat numai informația genetică esențială vieții parazitare și structuri proteice prin care se atașează la celula gazdă;

- **teoria originii celulare** - consideră că virusurile provin din subunități celulare autonomizate (de exemplu, din transposomi, vezi capitolul 1);

- **teoria evoluției paralele** - susține că apariția virusurilor a fost simultană cu a celorlalte forme vii. Virusurile s-au oprit în evoluție ca molecule autoreplicative încă în epoca primitivă - prebiotică - a "lumii ARN".

CARTOGRAFIEREA GENOMULUI VIRAL

Posibilitățile tehnice recente permit virusologilor să identifice porțiunile genomului viral care codifică anumite funcții. De aici și până la ingineria genică care poate să obțină, spre exemplu, variante atenuate prin deleția unor segmente responsabile de virulență sau neutrotropism este un singur pas. Dată fiind aplicabilitatea largă a tehnicilor de cartografiere și rezultatele spectaculoase obținute, menționăm câteva dintre ele:

- analiza fragmentelor rezultate din clivarea ADN genomic cu enzime de restricție;

- recuperarea mutantelor condiționat letale;

- translarea speciilor definite de ARNm în sisteme aceluare și identificarea proteinelor rezultate (toate aceste tehnici sunt pentru virusuri ADN);

- cartografierea prin alterarea ARN consecutiv iradierii cu ultraviolete;

- cartografierea prin inhibiția inițierii translației cu anumite substanțe chimice (tehnici pentru virusuri ARN).

Toate metodele de comparare a secvențelor nucleotidice utilizate își propun două scopuri:

- estimarea distanțelor de împerechere între secvențe și

- deducția relațiilor filogenetice.

Distanțele între diferitele izolate HCV sunt adesea mari, astfel încât este necesară introducerea unor corecții pentru eventualitatea unor substituții. Metodele de calcul a distanțelor de împerechere diferă prin prezumțiile de la care pornesc privind procesul evolutiv. O metodă foarte utilizată "*Neighbour joining*" (legătura de vecinătate) pornește de la construcția unor matrice de asemănare. Măsura în care o variantă se apropie de una sau alta din matrice permite

așezarea ei pe o anumită ramură a arborelui genealogic, întrucât matricele corespund unui algoritm de înrudire genetică. O altă metodă utilizează secvențele direct, calculând probabilitatea maximă de apropiere cu maximă parcimonie (chibzuință), dar minimalizând intervenția evoluției. În final, deducția relațiilor filogenetice se concretizează în alcătuirea unor arbori filogenetici în care probele înrudite converg în grupuri (*bootstrap*), iar între grupuri se stabilesc grade de vecinătate.

Analiza secvențelor nucleotidice este un instrument indispensabil pentru stabilirea înruderii între diferitele tipuri de virusuri și pentru epidemiologia moleculară care obiectivizează filiația cazurilor. Totuși, această metodă sau acest ansamblu de metode are limite de confidență determinate, în primul rând, de lipsa de fidelitate a transcrierii virusurilor ARN, ca și de rata relativ ridicată a mutațiilor care survin în cursul persistenței virale.

Sinteză

Evoluția virusurilor și, implicit, relațiile dintre tulpini, specii, genuri sunt azi stabilite prin cartografierea genomurilor virale. Variabilitatea foarte pronunțată a virusurilor ARN în comparație cu dezoxiribovirusurile se explică prin absența mecanismelor de corecție a erorilor de transcriere. Totuși, ambele categorii de virusuri au o variabilitate pronunțată ilustrată de evidențierea mai multor tipuri de mutante virale și de interacțiuni genetice între virusuri.

BIBLIOGRAFIE

- Holland JJ. Genetic diversity of RNA viruses. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 1991;176.
Fields BN, Knipe DM (eds.). Field's Virology. Raven Press, 1995, cap. 6-9.
Enciclopedia of Life Sciences www.els.net (Nature Publ. Group, 2001)

FUNCȚIONAREA CELULEI PARAZITATE VIRAL

De reținut:

Dependența intimă a virusurilor de metabolismul celulei gazdă demonstrează adaptarea parazitului în vederea autopropagării. Exemple interesante de utilizare specifică a compartimentelor celulare de diferite virusuri sunt relevate de infecția celulelor polarizate (exemplu, celulele epitelului digestiv sau respirator). Acestea alcătuiesc suprafețele de internalizare sau de asamblare și eliberare pentru toate virusurile. Leziunile virale care compromit viabilitatea celulară conduc la necroză sau la apoptoză. Posibilitatea controlului apoptozei cu medicamente care interferează componentele moleculare ale procesului oferă noi perspective în tratamentul virozelor.

Virusurile - complexe macromoleculare quasiautonome - sunt propagate prin expresia genelor proprii. Genele virale - derivate din celulă în urma evoluției regresive - au obținut, prin selecție, avantaje în ceea ce privește eficiența transcrierii în raport cu genele celulei gazdă. În fiecare fază a ciclului replicativ viral astfel de avantaje apar vizibile și ele vor fi analizate la nivelul diferitelor componente ale celulei infectate.

MEMBRANA CELULARĂ

Membrana celulară prin structura sa mozaică, alcătuită din domenii cu funcții specifice, intervine în concentrarea selectivă și internalizarea materialului extracelular între care și virusurile. Sechestrarea particulelor în vezicule endocitare se numește *endocitoză*, iar internalizarea componentelor fluide se numește *pinocitoză*. Endocitoza este foarte eficientă când succedă cuplării receptorilor celulari de liganzi (*receptor mediated endocytosis of ligands*). Veziculele endocitare se acidifică prin acumularea protonilor permițând activarea hidrolazelor

acide. Hidrolazele transformă endosomul tardiv în prelizozom și pe acesta în lizozomi. În lizozomi are loc decapsidarea multor virusuri.

Receptorii membranali pentru virusuri se găsesc din abundență: 10^4 - 10^6 per celulă. Ei determină tropismul de țesut sau tropismul de organ al virusurilor.

Unele virusuri se internalizează prin fuziune mediată de glicoproteine virale, numite factori de fuziune (FF). FF compromit temporar integritatea membranei celulare însă ei trebuie activați de proteaze celulare.

Atașarea și internalizarea virusurilor la nivelul epiteliului mucoaselor respiratorie și digestivă sau la nivelul endoteliului vascular sunt dirijate de existența **celulelor polarizate**. Traversarea celulelor polarizate este dependentă de existența receptorilor virus-specfici la polul apical sau bazolateral. Polarizarea celulelor impune și sediul asamblării și eliberării virionilor progeni maturi. Procesul metabolic implicat în aceste ultime faze este cel de sortare și transfer vectorial al glicoproteinelor virale. De exemplu, virusurile gripale se eliberează la polul apical al celulelor din mucoasa respiratorie, pe când coronavirusurile se assemblează în vezicule intracelulare învecinate aparatului Golgi. Atât adsorbția, cât și eliberarea virusurilor pot antrena mecanisme patogenice. Adsorbția la multiplicități înalte, de infecție (mii de virioni per celulă) poate determina liza membranei celulare (*lysis from without*). Opus, în cursul eliberării, neuraminidaza gripală fluidifică și dispersează glicocalixul evidențiind antigene membranale, de obicei ascunse recunoașterii sistemului imun. Alte substanțe din matrixul extracelular, cum sunt proteoglicanii, sunt implicate în fixarea depozitelor de complexe imune care se formează în cursul infecțiilor virale persistente - vezi glomerulonefrita cu complexe imune din hepatita B cronică.

REȚEAUA INTRACELULARĂ DE MEMBRANE

Rețeaua intracelulară de membrane alcătuită din cisterne, vezicule și organite ocupă jumătate din volumul compartimentului citosolic. Unele organite intracelulare alcătuite din membrane ca mitocondriile (implicate în furnizarea de energie) și microsomi (implicați în procesele de detoxifiere) au un rol periferic în infecția virală.

Structurile cele mai importante afectate de infecția virală sunt reticulul endoplasmic și aparatul Golgi. Canaliculele acestor structuri asigură un flux dirijat între compartimentul intracelular și exterior. Reticulul endoplasmic cu ribozomi este numit rugos - "**rough**" - (RER), iar cel lipsit de ribozomi - neted - "**smooth**" (SER). Sinteza proteinelor virale are loc la nivelul RER de unde, datorită unor secvențe semnal, sunt dirijate către locurile de asamblare în virioni.

În cursul acestui pasaj, unele proteine sunt asezonate (îmbogățite) cu carbohidrați. Aparatul Golgi care este organizat în agregate de cisterne este compartimentul unde are loc completarea sintezei proteice, sortarea și distribuția glicoproteinelor către diferite regiuni ale membranei celulare. Grupele de cisterne Golgi orientate spre interiorul celulei (numite *cis*) au rolul de livrare a materialelor către organele centrale, în timp ce grupele de cisterne *trans* (orientate spre exterior) sunt implicate în transferul glicoproteinelor către lizozom sau membrana celulară, uneori în vezicule de clathrină. Anumite virusuri care posedă glicoproteine cu carbohidrați legați prin intermediul oxigenului (din reziduurile de serină) de polipeptide se asamblează la nivelul aparatului Golgi (coronavirusurile), în timp ce alte virusuri care leagă carbohidrați prin azot se asamblează la membrana celulară (virusurile gripale). Cel mai frecvent, glicoproteinele virale inserate în membrana celulară devin puncte de focalizare pentru celelalte componente virale: nucleoproteină, acid nucleic și inițiază procesul de înmugurire virală. La alte virusuri, la care glicoproteinele nu sunt esențiale pentru construcția virionului, acestea se inseră în membrana celulară, o fac rigidă și creează canale prin care virionii asamblați intranuclear sunt expulzați exterior celulei (herpesvirusuri).

CITOSOLUL

Citosolul constituie restul compartimentului citoplasmic în afara membranelor și organelor intracelulare. Proteinele sintetizate în citosol, numite proteine libere (*free-proteins*), sunt componente ale lanțurilor enzimatică. Aici se formează ribozomii, filamentele citoskeletonului și proteinele nucleozomului pentru cromatină. Poliribozomii angajați în sinteza precursorilor polipeptidici ai virusurilor sunt atașați cu un capăt de SER. Proteinele virus specifice sintetizate în citosol se acumulează în pooluri (depozite) și, de multe ori, sunt atât de abundente, încât formează agregate cristaline (incluzii) de particule virale mature.

Citoskeletonul conține trei tipuri de material fibros: microfilamente de actină, filamente intermediare și microtubuli. Filamentele de actină intervin în internalizarea virusurilor ca și în migrarea progenilor către locurile de asamblare și eliberare. Filamentele intermediare din celulele epiteliale, conjunctive, musculare și din neuroni conțin, respectiv: citokeratină, vimentină, desmină și proteine fibrilare acide gliale. Filamentele intermediare au fost implicate în asamblarea picorna- și reovirusurilor.

Microtubulii sunt cele mai subțiri elemente ale citoskeletonului. Funcțiile lor sunt notabile: transport axonal, mișcările cililor, mobilizarea granulelor de pigment etc. Microtubulii sunt utilizați de virusuri în

maniere diverse: dirijarea virusurilor internalizate către nucleu (adenovirusuri), propagarea septinevritică (rabie), asamblarea progenilor (reovirusuri).

NUCLEUL

Nucleul este un compartiment autonom în interfază. ADN genomic celular și proteinele asociate (histone etc.) alcătuiesc cromatina din multiple subunități: nucleozomii. Fără a aborda problema organizării ierarhice a nucleozomilor până la cromozomi, trebuie reținut că în cromatină fiecare genă se exprimă transcripțional ca o unitate. Virusurile deturneză procesul de transcriere a ADN celular și folosesc polimerazele celulare în sinteza componentelor proprii. Papovavirusurile, care au genom ADN circular organizat ca nucleozomi, deturneză cu multă eficiență acțiunea polimerazelor ADN și ARN celulare. Herpes- și adenovirusurile utilizează, de asemenea, polimerazele celulare. Virusurile gripale au anumite particularități. Ele au genom ARNss(-) fragmentat. Ele posedă o polimerază ARN în virion. Totuși, pentru a deveni funcțional, ARN-ul gripal trebuie să dobândească o secvență terminală 5' sintetizată de polimerazele celulei gazdă. Datele histologice probează existența în nucleu a unor zone de concentrare cristalină a particulelor virale (herpes-, adenovirusuri), ceea ce relevă permeabilizarea membranei nucleare în cursul infecției.

MOARTEA CELULARĂ ȘI APOPTOZA

Homeostazia tisulară implică un echilibru dinamic între moartea celulelor și înlocuirea lor în urma proliferării celulare. Moartea celulară nu survine numai brutal, în condiții patologice - bine cunoscutul proces de **necroză**, ci și în mod programat, fiziologic - fenomen descris în 1972 de Kerr, Wyllie și Currie sub numele de **apoptoză**. În fapt, apoptoza și necroza sunt extremele unui spectru, ambele putând fi induse în aceeași celulă, de același agent, ce acționează însă în circumstanțe diferite.

Necroza este un proces ireversibil rezultat din combinarea mai multor mecanisme ce pot opera simultan:

- ruptura membranei plasmactice, care survine sub acțiunea perforinelor (proteine formatoare de pori) sau prin hernierea citoplasmei, în urma pierderii ATP și desfacerii legăturilor membrană citoplasmică/citoschelet;

- pierderea homeostaziei ionice intracelulare, în special prin aflux de Ca^{2+} ;

- stres oxidativ prin ruperea echilibrului oxidanți - antioxidanți (cu rol important pentru radicalii intermediari de oxigen, peroxidarea lipidelor și depleția în glutatation);

- disfuncția mitocondrială și pierderea ATP ca urmare a permeabilizării membranei mitocondriale;

- activarea hidrolazelor: proteaze, fosfolipaze, endonucleaze.

În urma unor dereglări ale homeostaziei ionice, are loc influxul de apă și ioni din compartimentul extracelular, cu dezintegrare consecutivă a mitocondriilor, umflarea și liza celulei. Conținutul citoplasmatic, incluzând enzimele lizozomale, este eliberat în fluidul interstițial, ceea ce determină leziuni tisulare extensive cu răspuns inflamator intens, urmat eventual de cicatrizare. Necroza determină distrugerea unor grupuri de celule ca urmare a unor variații extreme față de condițiile normale (hipertermie, hipoxie) sau a acțiunii unor factori litici (virusuri, complement etc.) ce produc alterarea și disrupția membranei plasmactice.

Apoptoza este sub control genetic și poate fi inițiată de:

- stimuli fiziologici;

- îmbatrânire (inițiată de "ceasul intern" al celulei);

- înfometare;

- agenți extracelulari solubili: hormoni, citokine;

- celule imunocompetente: limfocite T citotoxice, celule NK;

- agenți virali și alți factori nocivi (fizici, chimici) din mediu.

Apoptoza este întâlnită în cursul turnoverului celular normal, în embriogeneză, în dezvoltarea sistemului nervos, în atrofia tisulară endocrino-dependentă și în inducția și menținerea toleranței imunitare. În afara efectului fiziologic benefic al apoptozei, activarea inapropiată sau timpurie a morții celulare programate poate contribui la patogenia unor boli variate, incluzând: viroze, boli neurodegenerative, șocul ischemic.

O trăsătură constantă în toate formele de apoptoză (chiar și în cele incomplete, descrise recent sub numele de apoptoză atipică) este faza de integritate membranară prelungită ce servește pentru a reține conținutul celulei moarte pentru încă 1-2 zile. Totuși, schimbări subtile intervenite pe fața externă a membranei permit recunoașterea și înlăturarea celulelor încă din primele 1-2 ore după debutul apoptozei de către macrofagele și celulele epiteliale adiacente. Astfel au loc: expresia vitronectinei, pierderea asimetriei membranei fosfolipidice, expresia unor grupări carbohidrat. În general însă, neproducându-se răspândirea conținutului celular, apoptoza nu este asociată cu reacție inflamatorie și cicatrizare in vivo. In vitro, corpii apoptotici și fragmentele celulare se umflă și în final se produce liza - numită generic "necroză secundară".

Trăsăturile morfologice și biochimice ale celulelor apoptotice sunt sumarizate în tabelul 5.1.

TABELUL 5.1

TRĂSĂTURI DISTINCTE ALE NECROZEI ȘI APOPTOZEI

Modificări morfologice	NECROZA	APOPTOZA
	pierderea integrității membranare	menținerea integrității membranare
	picoza cromatinei	agregarea cromatinei la membrana nucleară
	umflarea și liza celulei	condensarea celulei
	liza completă fără formare de vezicule	formarea corpurilor apoptotici
	dezintegrarea organitelor	organite citoplasmatiche intacte
Modificări biochimice	pierderea homeostaziei ionice	proces controlat, implicând etape de activare și enzimatiche
	proces pasiv, fără consum de energie, se produce și la 4°C	proces activ, dependent de ATP, nu are loc la 4°C
	digestie random a ADN-ului (dăre în electroforeză)	digestie sub acțiunea unei endonucleaze endogene cu producerea unor fragmente oligonucleozomale de ADN ("ladder pattern")
	fragmentare postlitică a ADN-ului (tardiv)	fragmentare prelitică a ADN-ului (timpuriu)

Cromatina nucleară se agregă în mase dense ce se fragmentează și se deplasează spre membrana nucleară intactă. Nucleul și citoplasma se condensează, iar celula este fragmentată în corpi apoptotici conținuți încă în membrana celulară. Corpii apoptotici conțin ribozomi, mitocondrii și material nuclear.

Marca biochimică a apoptozei este degradarea extensivă și ireversibilă a ADN-ului genomic prin activarea unei endonucleaze endogene Ca^{2+} și Mg^{2+} dependente. Enzima clivează selectiv ADN-ul la nivelul unor situsuri localizate între unitățile nucleozomale (ADN linker), generând astfel fragmente mono- și oligonucleozomale. Acestea sunt evidențiable prin electroforeză în gel de agaroză sub forma unor multipli ai unei subunități de aproximativ 180 bp, ce formează un "ladder pattern" (distribuție în scară). Este un fenomen prelitic, produs înaintea schimbărilor în permeabilitatea membranei celulare, spre deosebire de degradarea random, tardivă, după liza din necroză. Realizarea faptului că apoptoza reprezintă un proces activ, genetic controlat, a generat optimism privind posibilitatea controlului apoptozei cu medicamente care interferează componentele moleculare ale procesului.

REGLAREA APOPTOZEI

O problemă fundamentală este reglarea programului apoptotic: de ce numai unele celule sunt selectate să moară? Diferite sisteme

de semnalizare sunt implicate, dar ele interacționează cu un număr limitat de factori reglatori. Majoritatea componentelor celulare - gene și proteine - implicate în apoptoză sunt exprimate constitutiv în celulele de mamifer. Apoptoza nu necesită traducerea unor gene noi, însă activarea sau derepresarea unor gene existente poate fi necesară. Concret, mai mulți factori extracelulari de supraviețuire și receptorii lor au fost caracterizați. Factorii extracelulari de supraviețuire pot acționa fie antagonist cu proteinele proapoptotice, fie agonist cu proteinele antiapoptotice.

Cel puțin anumite componente ale programului apoptotic au fost conservate în cursul evoluției la poikiloterme, la homeoterme și chiar la mamifere. De exemplu, din familia cistein proteazelor care promovează apoptoza face parte **enzima de conversie a interleukinei 1 beta (ICE)**, precum și proteine cu același rol la nematode. ICE este o protează cu un substrat neobișnuit, clivând proteinele între acid aspartic și orice alt aminoacid (Asp-X). Același substrat îl mai are o singură enzimă de la mamifere: fragmentina sau proteinaza citotoxică. Fragmentul este o serin protează responsabilă și de apoptoza indusă de limfocitele citotoxice (CTL) asupra celulelor viral infectate. Deci, CTL induce mai degrabă apoptoza țintei decât necroza ei. O proteină a virusului vaccinal (crm A) este inhibitorie specifică a ICE și a apoptozei. În infecția cu VHB, interacțiunea limfocitelor citotoxice cu hepatocitele care exprimă AgHBs conduce la apariția corpiilor Councilman, care sunt hepatocite apoptotice.

Protein kinaza C (PKC) este un element decisiv în transducerea semnalelor proapoptotice. Între protooncogenele activate enumerăm *c-myc*, *c-fas*, *c-jun*.

Oncogena supresoare p53 are, de asemenea, rol proapoptotic. p53 este implicată în răspunsul apoptotic la leziuni cromozomiale, dacă acțiunea sa este anterioară debutului procesului apoptotic. Alte gene citate determină apoptoză ca urmare a incompatibilității unor semnale de creștere și diviziune.

O componentă esențială în inducerea apoptozei pare a fi **sistemul receptor Fas - Fas ligand** (proteina Fas a mai fost numită APO-1). Proteina Fas a fost identificată ca membru al superfamiliei de receptori TNF/NGF (*tumor necrosis factor/nerve growth factor*), în general implicată în evenimente proliferative și de creștere celulară. Fas uman este o moleculă de 325 de aminoacizi, cu o secvență semnal la capătul aminoterminal și o regiune transmembranală în mijlocul moleculei. Sistemul Fas R (receptor)/Fas L (Fas ligand) este prezent în activarea limfocitelor T. O activitate particulară a TNF-R și Fas R este transmiterea de semnale citotoxice ce conduc la moartea diferitelor tipuri celulare. Sistemul Fas R - Fas L joacă un rol important și în procesele apoptotice legate de dezvoltarea celulelor T și în inducția toleranței, ca și în citotoxicitatea independentă de Ca^{2+} a

limfocitelor T citotoxice. Când Fas L cuplează Fas R, celulele purtătoare de receptori Fas intră în apoptoză. Fas este exprimat la nivele înalte în limfocitele transformate cu virusuri, ca în leucemia cu celule T adulte (infecție cu HTLV 1) sau în limfomul Burkitt (infecție EBV). De asemenea, activarea limfocitară din infecția HIV este însoțită de hiperexpresia Fas. Expresia Fas este exacerbată de gamma interferon, de factorul de necroză tumorală (TNF alfa) sau de IL-2. Structura Fas sugerează funcționarea lui ca receptor pentru citokine. Disfuncții ale sistemului Fas au fost implicate în apariția bolilor limfoproliferative și a bolilor autoimune.

Două proteine antiapoptotice majore codificate de gena Bcl 2 au fost descrise la mamifere. Se pare că o genă unică este responsabilă de activarea sau inhibarea apoptozei. Această genă servește ca integrator al diverselor semnale apoptotice interne și externe. Este posibil ca activitatea genei să fie condiționată de un promotor spre care converg semnale pro și antiapoptotice. Există numeroase proteine virale *Bcl 2 like*, ce par a crește supraviețuirea celulară: BHRF - din virusul Epstein-Barr, proteina E1b a adenovirusurilor etc.

Recent, o conexiune interesantă s-a făcut între procesul de mitoză și cel de apoptoză, o viziune extremă fiind aceea că apoptoza este o mitoză aberantă. Genele implicate în reglarea proliferației celulare intervin și în apoptoză: p53, c-myc, Rb 1, E1A, cyclin D1, c-fas, p34, cdc2 kinaza.

Sinteză

Leziunile virale induse care duc la compromiterea funcțiilor celulare nu sunt totdeauna rezultatul lizei (necrozei) celulare. În multe infecții se produc dereglări ale programului apoptotic care extind patologia virală. Activarea inapropiată sau timpurie a morții celulare programate poate contribui la patogenia unor boli variate incluzând virozele cronice și cancerul.

BIBLIOGRAFIE

- Klein G. Virus latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. *Cell* 1989;58:5-8.
- Levy JA. Pathogenesis of HIV infection. *Microbiol. Rev.* 1993;57:183-289.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME et al. *Nature* 1995;373:117.
- Cohen JJ. *Immunol. Today* 1993;14:126.

PATOGENIA INFECȚIEI VIRALE

De reținut:

Virusurile determină infecții acute, autolimitante sau infecții persistente (vezi capitolul 7). Simptomatologia infecțiilor acute este rezultatul replicării virusurilor la poarta de intrare sau al diseminării lor - pe cale viremică sau septinevritică - și afectării organelor țintă. Patogenia simptomelor este fie urmarea efectului citopatic viral, fie a fenomenelor imunopatologice rezultate din răspunsul imun al gazdei.

CADRU GENERAL

Cunoștințele privind replicarea virusurilor, respectiv, interacțiunea virus - celulă gazdă, capătă valoare practică în măsura în care putem explica relația virus - organism gazdă și evoluția ciclică a virozelor. Trebuie observat că aspectele abordate în acest capitol nu pot fi despărțite de analiza răspunsului imun și a altor mecanisme de apărare nespecifică care afectează rezoluția virozelor.

O noțiune importantă în patogenia infecțiilor virale este conceptul de *iceberg* care statutează existența frecventă a formelor asimptomatice sau inaparente de boală (tabelele 6.I și 6.II). De exemplu, în cazul poliomielitei, fiecărui caz paralic îi corespund în jur de 100 de îmbolnăviri asimptomatice. Acestea din urmă au un rol epidemiologic major, lăsând surse de virus să circule necontrolat și să contribuie la difuzarea virusului în colectivitate. Puține sunt excepțiile în care fiecare infecție este clinic manifestă, cum se întâmplă în turbare.

Virulența rezumă efectul variatelor mecanisme prin care agenții infecțioși își manifestă patogenitatea. Virulența este condiționată de factori care țin de:

- gazdă: vârstă, sex, stare de nutriție, rezistență imună etc.,
- virus: doză, cale de inoculare, pasaje anterioare ale tulpinii virale,
- mediu: climă, factori demografici, de educație și religie etc.

TABELUL 6.I

CONCEPTUL DE "ICEBERG" PRIVIND PATOGENIA VIROZELOR

<i>Răspuns la nivel celular</i>	<i>Efecte la nivelul macroorganismului</i>
Liză celulară	Moartea organismului
Disfuncții celulare, incluzii, transformare	Simptome clinice
Multiplicare virală abortivă	Infecție inaparentă
Expunere fără adsorbție	Grupe de risc

Vârsta în momentul infecției este frecvent un element determinant al simptomatologiei. De exemplu, adulții sunt mai susceptibili decât copiii mici la consecințele paralitice ale infecției poliomielitice. Tot adulții fac mai des complicații pneumonice în infecția cu virusul varicela-zoster, iar orhita complică oreionul practic numai după pubertate. Invers, virusul herpetic determină infecție generalizată și encefalită herpetică numai în cazul infecției nou-născutului, în cursul travaliului. Sursa contaminării este infecția herpetică genitală a gravidei. Hepatita B, transmisă la fel, intra- sau post-partum, de la mamă la nou-născut, are consecințe dintre cele mai severe la acesta din urmă. Riscul cronicizării și al apariției tardive a carcinomului hepatic este de peste 10 ori mai mare în cazul infecției cu virusul hepatitei B la nou-născut. Adenovirusurile sau virusul respirator sincițial determină infecții severe în cazul infecției copiilor în primii ani de viață și numai infecții blânde la adulți.

TABELUL 6.II

RAPORTUL DINTRE FORMELE INAPARENTE ȘI SIMPTOMATICE DE INFECȚII VIRALE

<i>Viroza</i>	<i>Simptomul considerat</i>	<i>Raportul forme inaparente/simptomatice</i>	<i>Procente infecții simptomatice</i>
Poliomielita	paralizii	300/1	0,33
Hepatita A	icter	100/1	1
Rubeola	rash	3/1	30
Gripa	febră, rinoree	60/100	60
Rujeola	rash, febră	99/100	1/1
Turbarea	encefalită	99	100

Un alt factor care influențează evoluția infecției este statusul nutrițional al gazdei. Acțiunea nu este mijlocită numai de deficitul imunitar asociat malnutriției, ci este uneori legată evident de absența sau deficiența anumitor factori nutritivi. De exemplu, rujeola evoluează cu complicații oculare mergând până la cecitate în cazul deficitului de vitamină A.

Infecția HIV, în condiții de malnutriție, antrenează în cascadă o enteropatie severă, cu malnutriție proteică și calorică secundară.

Copiii cu imunodeficiențe congenitale prezintă particularități în funcție de veriga imună implicată. Agammaglobulinemicii vindecă fără complicații rujeola sau herpesul, în timp ce copiii cu imunodeficiențe celulare fac infecții letale cu aceste virusuri.

În condițiile prezente ale pandemiei SIDA se pune tot mai acut problema riscului administrării de vaccinuri vii atenuate la copiii cu infecție HIV. Ca urmare a diagnosticării unor complicații adenoidiene locoregionale în cazul administrării vaccinului BCG, au fost autori care au recomandat abținerea în administrarea vaccinurilor virale vii la copiii HIV pozitivi. Riscul unor infecții severe cu virusurile sălbatice la copiii nevaccinați este însă mult mai mare decât riscul asociat vaccinării. Astfel, în cazurile în care infecția HIV nu este simptomatică, vaccinarea copiilor cu vaccinuri inactivate poate fi efectuată.

O noțiune adesea confundată cu virulența este **transmisibilitatea** în care determinant intervin factorii care țin de gazdă: momentul și durata contactului infectant, susceptibilitatea, rezistența imună etc.

Poarta de intrare. Accesul virusurilor în organism se realizează la nivelul celor trei suprafețe epiteliale principale: pielea și mucoasele (a), tractul respirator (b) și tractul alimentar (c). Anumite modificări patologice însoțesc acest stadiu timpuriu al infecției.

Astfel, inocularea virusurilor prin piele în urma leziunilor mecanice (mușcătura animalului turbat), în urma înțepăturii insectelor vehiculând arbovirusuri sau după intervenții medicale (injecții) cu instrumentar incorect sterilizat este punctul de plecare al unor infecții generalizate și, de regulă, nu determină modificări locale imediate. Totuși, sunt unele viroze care se rezumă numai la modificări cutanate locale. Negii sau verucile produse de papillomavirusuri, ca și "*mol-luscum contagiosum*", cauzat de un poxvirus, au ca leziuni histopatologice hiperplazia epidermului și leziuni inflamatorii proliferative.

Poarta de intrare respiratorie este folosită de multe virusuri: orthomixo- și paramixo-, picorna- și corona-, reo- și adenovirusuri. De cele mai multe ori, replicarea inițială în epiteliul respirator este urmată de generalizarea infecției. Sunt însă viroze respiratorii majore care se derulează exclusiv la nivelul mucoasei respiratorii. De exemplu, infecția câtorva celule cu virusul gripal determină producția masivă de progeni gripali diseminați de mucusul care peliculizează epiteliul tractului respirator spre alte zone, extinzând afectarea bronhopulmonară. Transsudatul care însoțește leziunile celulare favorizează diseminarea, după cum alți factori locali sunt limitativi. Între aceștia din urmă menționăm inhibitorii virali nespecfici din mucusul respirator, modificările de pH ale secrețiilor, sinteza mai tardivă a anticorpilor secretori locali. Leziunile respiratorii inițiate de virusuri sunt de cele mai multe ori cauza suprainfecțiilor bacteriene cu pneumococi și stafilococi care, în condiții normale, nu și-ar putea manifesta virulența.

Poarta de intrare digestivă este caracteristică virusurilor nonanvelopate, pentru că sensibilitatea celor cu anvelopă la pH acid, la detergenții din bilă și la acțiunea unor proteaze din suc digestiv previne accesul lor pe această cale. Picornavirusurile, reovirusurile, unele adenovirusuri, deși pătrund prin mucoasa digestivă, determină simptome locale inițial reduse. Patogenitatea lor este relevată numai după generalizarea multistadială a infecției. Sunt alte virusuri - asociate cu gastroenterite endemo-epidemice - care nu depășesc epiteliul digestiv. Rotavirusurile (din familia reoviridae) și agenții asemănători virusului Norwalk sunt patogeni primari și exclusivi ai epiteliului intestinal.

TABELUL 6.III

STADII ÎN PATOGENEZA VIRALĂ

1. Accesul în organismul gazdă
2. Replicare primară la poarta de intrare
3. Diseminare viremică sau septinevritică etc.
4. Tropism tisular, respectiv, celular
5. Replicare secundară în organul țintă
6. Dezvoltarea răspunsului imun al gazdei

DISEMINAREA SISTEMICĂ A VIRUSURILOR

Diseminarea virusurilor de la poarta de intrare se face cel mai frecvent pe cale sanguină prin viremie (tabelul 6.III). Participarea simultană a diseminării limfatice nu trebuie omisă. În câteva cazuri, generalizarea infecției se face pe calea tracturilor nervoase, prin septinevrită.

Vom exemplifica diseminarea viremică cu evoluția infecției rujeolice (pojarul). Poarta de intrare este respiratorie. Replicarea locală sau în țesutul adenoidian din inelul Waldayer determină producția de virus suficient pentru diseminarea viremică. Aceasta este viremia primară, în sânge virusul fiind asociat limfocitelor. Limfocitele nu sunt un simplu vector, ci și un substrat celular permisiv replicării virale. Virusul din sânge este în mod continuu îndepărtat de celulele sistemului reticuloendotelial, ceea ce determină afectarea unor organe cu circulație bogată: plămâni (bronhopneumonia rujeolică), urechea medie (otita), sistemul nervos central (encefalita rujeolică) sau chiar derm (rashul rujeolic). Replicarea masivă în aceste "organe țintă" este sursa unui al doilea val viremic: viremia secundară. Amploarea acesteia este limitată de sinteza de anticorpi specifici care contribuie la vindecarea infecției împreună cu o varietate de mecanisme efectorii ale imunității celulare. Trebuie menționat schematismul descrierii anterioare care nu explică varietatea simptomatologiei rujeolice. Spre exemplu, epiteliul conjunctival a fost creditat cu rolul de poartă de intrare, susținându-se că ochelarii ar putea proteja copiii din anturajul unor surse de infecție. Implicarea sistemului nervos central poate

avea loc pe căi multiple: prin plexul coroid, prin meninge - ependim - sau pe la nivelul vaselor cerebrale. Fagocitarea virusului de către sistemul reticuloendotelial explică traversarea barierei hematoencefalice și afectarea celulelor gliale și a neuronilor.

Virusurile în sânge pot fi vehiculate și în alte moduri decât asociate limfocitelor. De exemplu, o serie de arbovirusuri sunt adsorbite de eritrocite, parvovirusurile au fost evidențiate atașate la trombocite, iar multe picornavirusuri circulă liber în plasmă. În fine, în alte viroze viremia este mixtă: virusul este în parte asociat elementelor figurate, în parte liber în plasmă.

EVOLUȚIA CICLICĂ A INFECȚIILOR VIRALE

Virozele evoluează în patru stadii succesive:

- incubajia - perioada de la contactul cu sursa infectantă la debutul simptomelor;
- perioada de debut - asociată, de obicei, viremiei primare;
- perioada de stare - în care asistăm la replicarea în "organele țintă";
- perioada de convalescență - care conduce la vindecare.

Durata fiecărui stadiu este caracteristică virozelor, cu unele variații în funcție de particularități de vârstă, sex, patrimoniu genetic, coinfecții sau intervenții terapeutice etc. Distincția între evoluția infecțiilor sistemice și cele limitate la poarta de intrare se referă, în special, la contagiozitate (excreția de virus) și durata replicării virale.

TABELUL 6.IV

DURATA INCUBAȚIEI ÎN UNELE VIROZE

Viroza	Incubația medie (zile)	Limitele incubației
Gripă	2-3	1-4
Guturai	2-4	1-5
Adenoviroze	3-6	2-8
Herpes primar	6-8	5-14
Poliomielită	6-8	4-12
Rujeolă	10-11	9-12
Varicelă	14-15	13-21
Oreion	17-19	12-24
Rubeolă	17-19	14-21
Mononucleoză	30-35	10-50
Hepatita A	25	21-42
Hepatita B	75	60-180
Hepatita C	50	42-60
Rabie	15-60	10-360

Constanța perioadei de incubație este caracteristică, deși insuficient explicată (tabelul 6.IV). Incubația este mai scurtă în cazul virozelor în care simptomatologia este în întregime determinată de replicarea virusului la nivelul porții de intrare (1-3 zile). Pe de altă parte, virozele generalizate în mod stadial au incubația de 2-3 săptămâni. În fine, virozele determinate de lentivirusuri și oncovirusuri au incubația până la câțiva ani sau decade. În aceste cazuri, integrarea genomului viral în genomul celulei gazdă determină o lungă latență până la acțiunea unor cofactori care activează provirusul din starea dormantă.

Durata celorlalte perioade și chiar expresia lor este influențată de particularitățile gazdei și de intervențiile terapeutice. Forme clinice diferite, cum ar fi infecțiile inaparente sau subclinice, sunt practic lipsite de perioade de debut sau stare. Alte forme supraacute sau fulminante conduc rapid la moartea gazdei prin fenomene hipertoxice.

Trebuie menționat și subiectivismul în aprecierea simptomatologiei, spre exemplu, altul este înțelesul unei infecții subclinice pentru copiii răsfățați ai unor familii prospere și altul pentru familiile cu mulți copii din țărilor în curs de dezvoltare.

Patogenia infecțiilor generalizate cu rash. Erupțiile generalizate care însoțesc multe viroze sunt determinate imunopatic. Începutul sintezei de anticorpi face ca antigenul viral prezent în celulele dermului să fie recunoscut. Se formează complexe imune care determină hiperemie și exsudat - substratul histopatologic al leziunilor maculopapulare. În alte viroze cutanate acțiunea direct citopatică a virusului explică formarea veziculelor și a pustulelor. De exemplu, leziunile din herpes sau varicelă sunt determinate de hiperplazia dermică și degenerarea balonizantă a celulelor infectate, cu apariția incluziilor intranucleare. În herpesul neonatal, atât la nivelul pielii, cât și în organe, se întâlnesc zone de necroză focală cu reacție infiltrativă cu celule mononucleare, perifocal. Incluziile intranucleare conțin antigen viral în primul stadiu al infecției. Tardiv, incluziile pierd antigenul viral, fiind "cicatrice" ale infecției. Infecția fătului cu virusul herpetic (mai ales tipul 2 - herpesul genital) se produce în cursul expulziei prin contaminare de la leziunile genitale ale mamei. De aceea, prezența leziunilor herpetice la gravide în ultimul trimestru al sarcinii constituie o indicație pentru intervenție cezariană.

Patogenia neurovirozelor. Virusul rabic infectează omul în urma mușcăturii animalului rabigen multiplicându-se, inițial, în țesutul conjunctiv dermic sau muscular. Propagarea sa ulterioară este centripetă, pe traiectele nervoase, către sistemul nervos central. Leziunile patomonice găsite la nivelul cornului Amon sugerează replicarea preferențială în această zonă. Ulterior, diseminarea periferică se face centrifug, tot pe traiectele nervoase. Virusul rabic nu a fost izolat din sângele animalelor infectate.

Perioada de incubație depinde de distanța dintre locul de inoculare și encefal. Mușcăturile la față sau la membrele superioare conduc mai timpuriu la boală, comparativ cu mușcăturile la nivelul membrilor inferioare.

În afara invaziei SNC pe cale septinevritică, alte virusuri infectează creierul consecutiv diseminării viremice (exemplu, enterovirusurile, arbovirusurile). Există câteva căi pentru traversarea barierei hematoencefalice: transferul prin endoteliul vascular al vaselor mici cerebrale, transferul consecutiv infecției meningelor sau la nivelul plexului choroid. Infecția SNC este caracterizată de trei leziuni: necroză celulară, neuronofagie și infiltrat mononuclear perivascular. Virusul rabic, care nu este citocid, ca și agenții encefalopatiilor subacute spongiforme, prezintă leziuni diferite de tabloul clasic al encefalitei virale: degenerare neuronală și vacuolizare, leziuni inflamatorii minime sau absente. În aceste cazuri afectarea neuronală, deși puțin evidentă morfologic, pare a viza funcțiile înalt specializate ale celulelor infectate.

Sinteză

Evoluția virozelor acute este ciclică, parcurgând următoarele faze: incubație, debut, stare și convalescență. Incubația este scurtă, în cazul virozelor limitate la poarta de intrare, sau lungă și foarte lungă (lentivirusuri), în cazul diseminării sistemice. Debutul este caracterizat de simptome nespecifice, generale, similare efectelor adverse ale terapiei cu interferon. Perioada de stare depinde de organele țintă afectate de replicarea virală și de răspunsul imun al gazdei. Mecanisme virale de eludare a răspunsului imun, dar și deficiențe imunitare ale gazdei conduc uneori la infecții cronice, persistente.

BIBLIOGRAFIE

- Mims CA. The pathogenesis of infectious disease, 4th ed. Academic Press, London, 1995.
- Chisari FV. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol. 1995;13:26-60.

CAPITOLUL 7

PERSISTENȚA VIRALĂ

De reținut:

Proprietăți intrinseci replicării virale, cât și particularități ale răspunsului imun al gazdei contribuie la transformarea unor infecții acute în infecții persistente. Mecanismele virale implicate în inițierea și menținerea persistenței sunt: generarea particulelor defectiv interferente, apariția unor mutante virale, variația antigenică, integrarea genomului viral etc. Infecțiile persistente inaparente sunt foarte răspândite, dar exprimarea lor clinică, mai frecventă în prezent, este asociată unor circumstanțe particulare: imunosupresia, îmbătrânirea.

CADRU GENERAL

Infecțiile virale persistente sunt importante din mai multe puncte de vedere:

- facilitează continuitatea lanțului epidemic în colectivități mici sau izolate;
- pot fi reactivate în cursul stărilor de imunosupresie;
- unele determină, în timp, apariția leziunilor cronic evolutive;
- leziunile evolutive din infecțiile persistente pot conduce la neoplasme;
- unele sunt imunosupresoare și facilitează expresia clinică a unor germeni oportuniști.

Fenner și White definesc infecțiile virale persistente drept condițiile în care virusul sau, cel puțin, genomul viral, sunt conservate în organismul gazdă o perioadă îndelungată de timp. Varietatea manifestărilor clinice în cursul persistenței virale impune o clasificare. Am adoptat o împărțire în care fiecare categorie in vivo are un corespondent in vitro, în culturi de celule. Modelele persistenței virale in vitro lămuresc mecanismele patogenice specifice fiecărui tip de persistență. Clasificarea noastră cuprinde:

- infecția cronică in vivo și culturile echilibrate (*steady state*) in vitro;

- infecția latentă și culturile purtătoare (*carrier cells*);
- infecția lentă și culturile transformate.

Există două fațete ale relației virus - gazdă care facilitează cronicizarea unei infecții virale. În primul rând, virusul per se sau variantele rezultate in vivo nu sunt citopatogene. În al doilea rând, celula infectată trebuie să nu fie recunoscută de sistemul imun sau efectorii imuni să nu aibă acțiune virus - neutralizantă. Virusul hepatitei B (VHB) nu este citopatogen și, de multe ori, purtătorii cronici de AgHBs au o histologie normală a biopsiei hepatice. Pe de altă parte, o caracteristică a răspunsului imun în cursul infecțiilor virale cronice este exteriorizarea antigenelor interne. Concret, în hepatita cronică asistăm la sinteza de anticorpi direcționați în raport cu antigenul de centru al VHB (antiHBc), anticorpi care nu au proprietăți virus-neutralizante. Mecanismul leziunilor hepatice în hepatita cronică progresivă este imunopatic și rezultă din sensibilizarea celulelor imunocompetente la antigene celulare virus modificate.

Modelul in vitro pentru infecția cronică este reprezentat de culturile echilibrate în care genomul viral se replică independent de cel celular eliberând constant cantități mici de virus. În general, culturile echilibrate sunt rezultatul infecției cu virusuri noncitopatogene. Fiecare celulă este infectată însă producția de virus este limitată.

INTERACȚIUNEA VIRUS - CELULĂ GAZDĂ ÎN INFECȚIA PERSISTENTĂ

În funcție de permisivitatea celulei gazdă se pot distinge trei feluri de relații virus - gazdă: infecții productive, infecții semipermissive și infecții abortive (tabelul 7.1). De exemplu, în cazul adenovirusurilor umane cele mai multe tipuri dau infecții productive în celule epiteliale umane. Fibroblastele umane sau de șoarece produc concentrații (titruri) de virus foarte scăzute - ele reprezintă un sistem semipermisiv. În fine, culturile de celule de hamster sunt infectate abortiv datorită unei blocări a ciclului replicativ în faza de sinteză a proteinelor virale tardive. Infecția abortivă cu serotipurile 12, 18, 31 poate duce la transformare celulară. Celulele de hamster transformate sunt caracterizate de prezența genomului adenoviral în formă integrată intracromozomial și de sinteza unora din proteinele timpurii. Genomul adenoviral persistă ani de zile în celulele amigdalelor la om fără a determina însă transformare malignă. De altfel, prezența genomului nu pare a fi esențială pentru transformare.

TABELUL 7.I

CATEGORII DE RELAȚII VIRUS - ORGANISM GAZDĂ

Tip de infecție	Progeni infectanți	Liza celulară	Semne și simptome	Durata evoluției
acute	+++	+++	+++	scurtă
inaparente	+++	0/+	0	scurtă
persistente	+	+	+/-	lungă
• cronice	++	++	++	lungă
• latente	-/+	-	+/-	lungă
• lente	+	+	+	lungă

Pentru înțelegerea la nivel molecular a stării de permisivitate, semi- sau nonpermisivitate este necesară determinarea funcționării promotorilor virali în țesuturi de la anumite specii și din diferite organe. Infecția productivă se produce numai când factorii celulari de promovare a transcrierii recunosc secvențe (motive) specifice în promoterii virali. Cel puțin doi factori celulari proteici (factorul nuclear I și II) cu activitate topoizomerazică participă la inițierea replicării ADN viral. Cele mai multe gene adenovirale sunt transcrise după un program complex de către polimerazele ADN dependente de ARN ale celulei gazdă. Reglarea acestui program este facilitată de secvențe și structuri conformaționale din promoterii virali.

TABELUL 7.II

INFECȚII VIRALE PERSISTENTE LA OM

Virusul	Sediul persistenței	Consecințe	Excreție de virus
HS; VZ	ganglioni senzitivi	reactivări; zona zoster	numai în reactivări
CMV	limfocite T	reactivări	în imunosupresii
EBV	limfocite B; epiteliu faringian	limfoame (limfom Burkitt), carcinom nazofaringian	absentă
VHB	hepatocit	hepatită cronică	continuuă
Adeno-	amigdale	fără	prezentă
Polyoma: BK, JC	rinichi	fără	în imunosupresii
HTLV	limfocite	rar leucemii	absentă
Rujeolos	creier	PESS	absentă
HIV	limfocite; macrofage	infecții lente	continuuă

Latența și persistența (ca și oncogenitatea) virusurilor ADN (tabelul 7.II) sunt însoțite de integrarea genomului viral (sau a unor părți din el) în genomul celulei gazdă. În alte sisteme, ca, de exem-

plu, în celulele limfoide care poartă genomul virusului Epstein-Barr, ADN viral poate persista neintegrat ca specii episomale libere de ADN care se replică sincron cu genomul celulei gazdă. Problema integrării genomului viral în situsuri specifice ale genomului celular (și nu la întâmplare) are o importanță medicală deosebită. Integrarea ADN viral în genomul gazdei promovează mutageneza inserțională. Mutageneza în anumite situsuri este asociată cu primele evenimente din transformarea malignă. Din punct de vedere genetic, acest model de oncogeneză virală este cel mai plauzibil, pentru că analiza unor linii celulare inițiate din culturi transformate cu adenovirusuri a relevat inserția nespecifică. Fragilizarea genomului la punctul de inserție asigură promovarea recombinărilor genetice.

Există situații în care infecția persistentă poate corecta stări patologice preexistente. De exemplu, în linia de șobolani BB care fac spontan diabet insulino-dependent infecția persistentă cu virusul choriomeningitei limfocitare (LCM) reduce incidența diabetului. LCM infectează limfocitele CD4 pozitive care constituie veriga efectorie a răspunsului autoimun împotriva celulelor beta din pancreas. La copiii bolnavi de SIDA și infectați simultan cu virusul hepatitei B, hepatita evoluează mai trenant datorită depleției acelorasi limfocite CD4 pozitive lizate de infecția HIV. Infecția simultană cu virusul hepatitei C este însă agravantă atât pentru hepatită, cât și pentru evoluția infecției HIV.

PERSISTENȚA VIRALĂ ȘI RĂSPUNSUL IMUN

Multe virusuri persistă în organismul gazdei în ciuda răspunsului imun, datorită producției de variante antigenice care nu mai sunt recunoscute de efectori imuni. Cu alte cuvinte, tulpina infectantă inițial este diferită antigenic de cea izolată în cursul sau în stadiile finale ale bolii. Răspunsul imun este presorul selectiv care favorizează acumularea din populația virală heterogenă a acelor virioni care scapă recunoașterii imune. HIV este un astfel de exemplu pentru că rata excesivă a erorilor de transcriere a reverstranscriptazei face ca în orice moment, în organismul infectat, să existe mai multe variante (*quasispecii*) din care câte una devine temporar dominantă scăpând de supravegherea imunologică. Evoluția este ondulantă, rând pe rând, răspunsul imun - până la propria epuizare - reușind să controleze noile variante.

Supresia unor proteine gazdă critice pentru recunoașterea infecției este un alt mecanism prin care se instalează persistența (tabelul 7.III).

TABELUL 7.III

MECANISME DE ELUDARE A RĂSPUNSULUI IMUN CARE CONTRIBUIE LA INSTALAREA PERSISTENȚEI VIRALE

Efactori	Țintă	Mecanisme virale de eludare	Exemple
Anticorpi	Virus extracelular	Variația antigenică; Anticorpi blocați	Lentivirusuri Hepadnavirusuri
ADCC sau *ACMC	Virus intracelular	Latența virală Imunomodulare	Herpesvirusuri Paramixovirusuri
Celule T citotoxice	Celule infectate	Supresia antigenelor CMH; Diminuarea expresiei moleculelor de adeziune etc.	Adenovirusuri EBV în limfoame

*Citoliză mediată de anticorpi și complement.

Efactorii imuni celulari recunosc peptidele derivate din antigenele virale numai dacă acestea sunt legate de proteinele complexului major de histocompatibilitate (CMH). De cele mai multe ori, lanțurile alfa și beta ale CMH formează o nișă (fantă) în care peptidele viral derivate sunt expuse. Alteori, proteine virale numite **superantigene** pot fi recunoscute independent de restricția CMH. În fine, alte celule T purtătoare de receptori gamma recunosc proteine nonself apărute în urma acțiunii virale asupra celulei gazdă (de exemplu, recunosc și cuplează proteinele de șoc termic).

Sunt virusuri care interferează cu expresia proteinelor CMH și a altor proteine rezultate în urma procesului infecțios (tabelul 7.IV). Adenovirusurile inhibă expresia proteinelor CMH; HIV distruge celulele cheie ale răspunsului imun - celulele CD4 pozitive - și alterează funcția macrofagelor implicate în prezentarea antigenelor.

TABELUL 7.IV

UNELE PROTEINE VIRALE CARE MODULEAZĂ RĂSPUNSUL INFLAMATOR ȘI IMUN

Virusul	Proteina virală	Locul acțiunii
Adenovirusuri	Proteine timpurii: E1; E2	citoliza imună; antagonist TNF
Poxvirusuri	Proteine timpurii: T2	complement; antagonist TNF
Alphaherpesvirusuri	Glicoproteine ale anvelopei	complement; anticorpi
Gammaherpesvirusuri	Proteine virus Epstein-Barr	IFN; citokine
Retrovirusuri	HIV (tat)	rețeaua citokinelor

INFECȚIA PERSISTENTĂ CU EXCREȚIE DE VIRUS

Infecțiile cronice sau latente sunt însoțite de secreția continuă, respectiv, intermitentă de virus. De exemplu, virusul hepatitei B persistă în peste 10% din cazurile de infecție acută în România și, în același timp, constituie și cauza hepatitei cronice, cirozei și, uneori, a cancerului hepatic primitiv. Sângele și alte lichide biologice ale bolnavilor de hepatită B cronică reprezintă sursa de infecție pentru contacti. Ocaziile de transmitere sunt numeroase: transfuzia de sânge, refolosirea seringilor, acupunctura, tatuajul, ca și contactul sexual sau transmitia materno-fetală. Transmitia materno-fetală duce la cronicizări ale infecției copilului în 90% din cazuri. Vaccinarea antihepatită B nu reușește totdeauna să evite transmitia, chiar dacă debutează imediat după naștere.

Într-un studiu recent, Cernescu și colab. au arătat o eficiență redusă a vaccinării antihepatită B în România, în jur de 70%. Mulți dintre copiii care nu răspund la vaccinare (58%) au prezent AgHBs - marker al infecției evolutive. Pentru o prevenție mai sigură a infecției verticale se recomandă folosirea unor vaccinări cu concentrație antigenică dublă, simultan cu administrarea de imunoglobuline specifice anti-VHB. Hepatita C este, de asemenea, însoțită de cronicizări în peste 80% din cazuri, însă mecanismul persistenței este diferit. VHC este foarte variabil iar reinfecțiile sunt frecvente. În acest fel, răspunsul imun nu poate steriliza variantele nou achiziționate de bolnav.

Latența herpesvirusurilor este o altă cauză de infecții persistente cu excreție de virus numai în recidive. Recidivele herpetice nu sunt totdeauna simptomatice, încât putem asista și la excreția asimptomatică de virus. Infecția cu herpes simplex sau cu virusul Epstein-Barr este însoțită de excreția intermitentă de virus. Virusul citomegalic este excretat în urină sau în lapte la un procent considerabil din pacenții latent infectați.

Un grup de virusuri "neconvenționale" - prionii - agenți ai encefalopatiilor spongiforme transmisibile, persistă în organele infectate atât datorită sintezei continue, cât și datorită rezistenței neobișnuite la dezinfectanți. În fapt, în Marea Britanie, diseminarea "bolii vacii nebune" a coincis cu modificarea tehnologiei de prelucrare a carcaselor de animale (oi, bovine) care, de obicei, erau incluse ca adaus în hrana bovinelor sub formă de făină de oase. Carcasele nu au mai fost preluate prin extracție cu solvenți organici timp de 8 ore, urmat de expunerea la vapori supraîncălziți pentru îndepărtarea solvenților. Fără această procedură, infectivitatea prionilor se conservă, iar adausul în hrană a condus la epidemia de encefalopatie bovină spongiformă (EBS) transmisibilă și la om (vezi capitolul 31).

Kuru a fost o afecțiune neurologică prionică răspândită în Noua Guinee ca urmare a canibalismului ritual. În tribul Fore, unde, în semn

de respect, rudele celor decedați înghițeau creier de la cadavru, la o populație de 35 000 de oameni au apărut 3 700 de cazuri de boală Kuru. În majoritate au fost afectați copiii și femeile care mâncău creier, în timp ce bărbații care mâncău alte țesuturi nu s-au îmbolnăvit.

Boala Creutzfeldt Jakob (CJ) este o afecțiune rară, care apare în lumea civilizată sporadic. Boala CJ a fost asociată etiologic cu unele intervenții neurochirurgicale, cu administrarea de hormon somatotrop hipofizar preparat din hipofize de bovine sau chiar cu ingestia de carne de la animale cu EBS. Incubația în bolile citate este de 2 ani pentru scrapie la oi, de 4-6 ani pentru EBS și de 4-20 de ani pentru Kuru sau CJ. În tot acest interval prezența prionilor este demonstrabilă.

Alte virusuri care dau infecții persistente cu excreție continuă sunt polyomavirusurile și hantavirusurile. Hantavirusurile sunt excretate de rozătoare și determină la om glomerulonefrită și febre hemoragice. În cursul războiului din Coreea (1950) peste 3 000 de soldați americani au fost contaminați. În România, boala este răspândită în Banat și cunoscută ca nefropatie endemică balcanică. Creșterea excreției virusurilor latente se produce în cursul sarcinii și la bolnavii sub terapie imunosupresivă, ca și la bătrâni.

Infecțiile persistente cu excreție de virus reprezintă o modalitate eficientă de conservare a virusurilor în colectivități izolate cu densitate mică și cu natalitate redusă.

INFECȚIA PERSISTENTĂ FĂRĂ EXCREȚIE DE VIRUS

Aceste infecții persistente sunt importante mai ales pentru individ și nu afectează răspândirea infecțiilor în colectivitate.

Adenovirusurile pot persista în amigdale după infecția acută fără a se excreta și ele sunt considerate ca făcând parte din flora normală a orofarinxului. Virusul rujeolos, ca și unele enterovirusuri au fost creditate cu posibilitatea persistenței, iar patologia determinată sau, mai bine zis, atribuită lor a fost rezumată în tabelul 7.II.

Lentivirusurile și oncovirusurile ca exemple de persistență virală cu consecințe majore (transformare malignă) vor fi discutate în capitolele 22 și 33.

Sinteză

Persistența virală este o sechelă frecventă a infecțiilor acute. Infecția persistentă este semnificativă atât pentru menținerea unor virusuri în comunități mici și izolate, cât și din punctul de vedere al subiectului infectat. Tot mai frecvent, simptomatologia determinată de persistența virală devine evidentă la bătrâni, la subiecți imunosupre-

sați sau în oncologie. În măsura în care infecțiile acute vor fi limitate prin vaccinare, patologia asociată persistenței va căpăta o pondere mai consistentă. Unele vaccinuri vii atenuate pot conduce la infecții persistente.

BIBLIOGRAFIE

Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infections. Trends Microbiol. 1994;2:94.

Mims C. Pathogenesis of infectious disease, 4th ed. Academic Press.

Haaheim LR. A Practical Guide to Clinical Virology, 2nd ed. Wiley, 2002.

MECANISME ALE REZISTENȚEI ÎNNĂSCUTE ÎN VIROZE

De reținut:

Studii recente au descoperit două căi de semnalizare care activează imunitatea înăscută antivirală. Prima cale este inițiată de receptorii **TLR** (*toll-like receptors*), care detectează virusurile internalizate în endosom. Calea TLR induce sinteza de interferon tip I (alfa și beta). A doua cale utilizează ca receptor helicaza ARN codificată de gena inductibilă de acidul retinoic (**RIG-I**) și detectează ARN viral dublu spiralat genomic sau intermediarul replicativ. Ambele căi activează în final factori nucleari de transcriere, ca NFkB sau IRF (*interferon regulatory factors*).

Rezistența înăscută operează în infecții cu orice microorganism, inclusiv virusurile, și nu presupune un contact anterior între gazdă și agentul patogen. De aceea, rezistența înăscută mai este denumită nespecifică sau naturală. Opoziția între imunitate (rezistența specifică sau dobândită) și rezistența înăscută este justificată numai didactic. În realitate, cele două forme de apărare împotriva infecțiilor acționează sinergic. Aceași sinergie se constată și între efectorii imunității și ai rezistenței înăscute. Există efectori umorali și celulari, care sunt sintetizați în tabelul 8.1:

TABELUL 8.1

REZISTENȚA LA INFECȚII

Rezistența la infecții	Mecanisme umorale	Mecanisme celulare
Nespecifică (innăscută)	Lizozim, complement, Interferoni, Citokine proinflamatorii	Macrofage, Celule NK
Specifică (dobândită) poate fi: Naturală (postinfecție) Artificială: • activă (după vaccinare) • pasivă (transfer de anticorpi, IgG etc.)	Anticorpi: - Neutralizanți - Non-neutralizanți - Facilitatori	Celule foliculare dendritice Limfocite activate: - limfocite B - limfocite T _{H1} , T _{H2} - limfocite citotoxice

Susceptibilitatea la viroze, severitatea evoluției, răspunsul la antivirale depind de acțiunea concordantă a efectorilor rezistenței nespecifice și ai imunității.

CALEA TLR A IMUNITĂȚII ANTIVIRALE NESPECIFICE

Mecanismele imunității nespecifice au fost clarificate în ultimii ani odată cu descoperirea unei familii de molecule denumită **toll-like receptors (TLR)**. TLR sunt proteine transmembranale exprimate mai ales pe celulele prezentatoare de antigen, dar și pe fibroblaste, celule epiteliale etc. Există 11 feluri de TLR la om care recunosc componente structurale ale agenților patogeni (bacterii, virusuri, paraziți) și care, **în decurs de minute**, inițiază reacții de apărare, activând mai multe componente ale răspunsului imun. TLR3, 4, 7, 8 și 9 sunt receptorii care sesizează componente moleculare străine de gazdă (nonself) ca, de exemplu, nucleoproteine și acizi nucleici virali. ARNds (dublu spiralat) generat în cursul replicării unor virusuri este sesizat de TLR3. Experimente pe mai multe specii au demonstrat că TLR7 și 8 sunt esențiali pentru inducția interferonului 1 de către virusurile ARN, iar TLR9 pentru rezistența înăscută față de virusurile ADN. TLR9 sesizează ca structuri proprii ADN viral motivul CpG nemetilat. Un eveniment cheie în inițierea răspunsului imun înăscut este activarea genelor pentru interferonul (IFN) tip I. La nivel molecular, exprimarea genelor pentru IFN este fin reglată de semnale intra- și extracelulare generate de activarea factorului nuclear kappa B, pe de o parte, și de activarea factorilor de transcriere reglați de IFN (abreviat IRF). Răspunsul timpuriu în infecția virală este caracterizat de sinteza IFN beta și IFN alfa 1 (fig. 8.1):

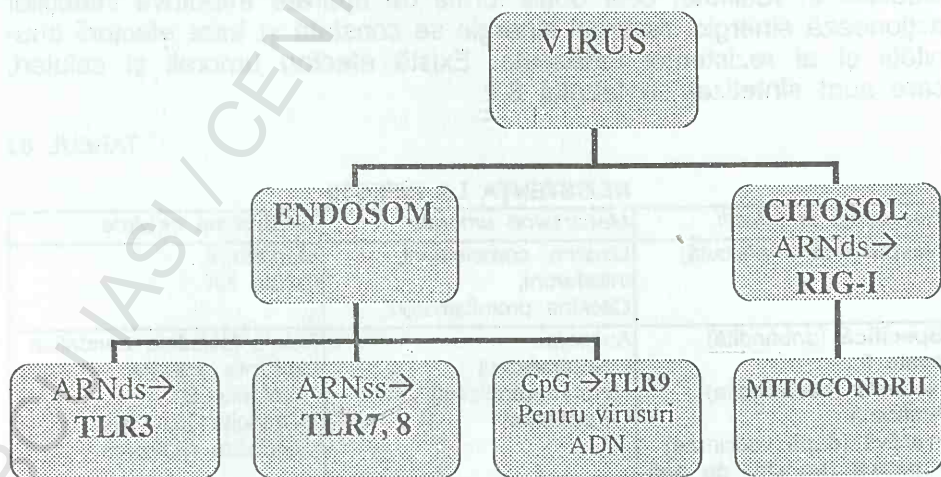


Fig. 8.1. Calea TLR a imunității antivirale nespecifice.

Recunoașterea modelului molecular asociat virusurilor patogene de către TLR inițiază o cascadă de semnale celulare care conduc la activarea unei importante căi nucleare de reglare a expresiei genelor: calea factorului nuclear kappa B. Genele controlate sunt implicate în inflamație, necroză și reparare celulară etc. Efectorii acestor reacții sunt:

- Producția de intermediari activi de oxigen.
- Producția de citokine proinflamatorii: interleukina 1, *tumor necrosis factor* alfa (TNF alfa), interferon gamma.
- Activarea celulelor NK (vezi mai jos). Există un interes considerabil pentru găsirea unor substanțe medicamentoase care să acționeze fie ca agonști (adjuvanți), fie ca antagonști ai TLR.

Toate speciile de IFN acționează într-o manieră paracrină (auto-catalitică). Au fost descifrate mai multe căi de semnalizare prin care se exprimă efectele biologice (nu numai antivirale) ale IFN:

- calea de semnalizare JAK-STAT conduce la stimularea elementelor care răspund la IFN (abreviat IRES) și care se regăsesc în sute de gene influențate de IFN;
- calea genelor inductibile de acidul retinoic (RIG-1) care recunoaște o gamă largă de ARN virali.

Cunoașterea căilor de semnalizare nu are numai importanță teoretică, ci indică anumite ținte care pot fi blocate prin medicamente. În plus, odată cu descoperirea TLR a putut fi explicat mecanismul acțiunii adjuvanților din formularea unor vaccinuri, ca și al eficienței unor vaccinuri folosite în imunotratamentul cancerului. Rotația mai multor vaccinuri cu adjuvanți distincți nu numai că este imunostimulatoare, dar previne pericolul autoimunității induse de vaccinuri

În concluzie, răspunsul imun înnăscut este faza inițială a apărării imune, eficientă împotriva unei game variate de virusuri. Răspunsul imun înnăscut influențează și răspunsul imun adaptativ, care este restrâns numai la virusul care a inițiat infecția. Virusurile au dezvoltat o serie de strategii care blochează răspunsul imun înnăscut și asigură micronișa necesară replicării virale. De exemplu, unele proteine nonstructurale ale virusurilor (NS1 la virusul gripal sau E2 și NS5A la virusul hepatitei C) inhibă acțiunea interferonului. Virusurile lipsite de aceste proteine nonstructurale sunt atenuate.

CELULE IMPLICATE ÎN IMUNITATEA NESPECIFICĂ

CFD: principala sursă de interferon este reprezentată de celulele foliculare dendritice (CFD) situate în derm și în structura altor organe. CFD sunt de două categorii: plasmacitoide și convenționale. Numai primele rețin ARN viral în endosom și inițiază producția promptă de interferon I (alfa și beta). CFD convenționale transportă rapid ARN

viral din endosom în lizozom și sunt slab producătoare de interferon.

Macrofagele, sau sistemul celulelor mononucleate fagocitare, provin din celulele stem pluripotente ale hematopoiezei. În circulație macrofagele sunt cunoscute ca monocite; în țesuturi ele participă la structura stromei ca, de exemplu: oligodendrocitele în SNC, celulele Kupffer în ficat, celulele foliculare dendritice în splină și în alte țesuturi limfoide etc.

Macrofagele constituie alături de barierele naturale (de exemplu, continuitatea epiteliului mucoaselor sau a dermului) unul din primele elemente mobilizate ca răspuns la infecții. Prin fagocitoză, prin sinteza și secreția unor factori direct sau indirect virulicizi, ca și prin imunomodularea altor efectori, macrofagele asigură controlul infecțiilor încă din primele ore ale debutului lor. Iată câteva exemple de mecanisme proprii macrofagelor:

- fagocitoza,
- generarea șocului oxidativ,
- producția de NO,
- sinteza **citokinelor proinflamatorii** ca, de exemplu: TNF alfa, interleukina 1, interleukina 12.

Trebuie subliniat că răspunsul inflamator care este necesar pentru îndepărtarea agenților patogeni sau a celulelor infectate conduce la leziuni celulare importante și în țesutul neinfecat. Leziunile sunt consecința atât a replicării virusurilor, cât și a reacțiilor de apărare mobilizate de gazdă. De aceea, vindecarea virozelor depinde de balanța delicată între mediatorii solubili proinflamatorii și antiinflamatorii.

CALEA RIG-I A IMUNITĂȚII ANTIVIRALE NESPECIFICE

Gena **RIG-I** inductibilă de acidul retinoic a fost identificată ca sursă a helicazei pentru ARN viral dublu spiralat (ARNds). Mai multe proteine ale unor virusuri pot interfera cu calea **RIG-I** determinând exacerbară infecțiilor virale. Importanța relativă a celor două căi a putut fi studiată pe fibroblaste deletate pentru una din cele două categorii de receptori. În acest sistem experimental s-a constatat lipsa de redundanță și chiar sinergia celor două căi (posibil, și a altora suplimentare) în activarea imunității antivirale nespecifice.

CITOKINELE ȘI CHEMOKINELE

Citokinele și chemokinele sunt substanțe rapid sintetizate postinfecție care au efecte locale și sistemice dramatice. Citokinele asi-

gură cooperarea dintre subseturile de celule imunocompetente și coordonează răspunsul inflamator. În plus, citokine precum: **IL-1, TNF alfa/beta, IL-6, interferonul (IFN) alfa/beta, IL-8 și MIP - macrophage inflammatory protein-1 alfa**, sunt pirogeni endogeni puternici. Chemokinele (un set de citokine) sunt chemoatracanți care mobilizează diferiții efectori imuni la sediul infecției virale. Multe citokine sunt detectate la poarta de intrare dar și sistemic la puține ore de la debutul infecției virale. În hipotalamus există o regiune expusă, privată de existența unei bariere hematoencefalice restrictive, numită *organum vasculosum laminae terminalis*, la nivelul căreia pirogenii endo- sau exogeni pot determina un răspuns dependent de doză constând în sinteza de prostaglandine (în special, prostaglandina E₂). Acești mediatori resetează mecanismul de termoreglare inițiind răspunsul febril. Amploarea acestuia este predictivă pentru severitatea formei clinice și frecvența complicațiilor. Trebuie menționat că mai multe citokine și chemokine contribuie sinergic, prin efectele lor pleiotrope, la simptomatologia sistemică, dar și la cea locală din viroze. Sinteza de citokine, influxul de granulocite și celule NK, activarea unor receptori la nivelul epiteliului respirator pregătesc terenul pentru edificarea răspunsului imun adaptativ.

Citokinele antiinflamatorii sunt interleukinele 4, 10 și TGF beta (*tumor growth factor*). Aceste citokine sunt produse și de alte celule decât macrofagele (de exemplu celule NK, limfocite T, B) dar toate contribuie la "dezactivarea" macrofagelor. Tardiv în infecție macrofagele devin refractare la stimularea exercitată de citokinele proinflamatorii și astfel se limitează amploarea distrugerilor țesutului neinfestat.

Celulele NK (natural ucigașe) sunt limfocite granulare mari, care conferă rezistență înnăscută. Ele au fost inițial caracterizate pe baza acțiunii citolitice asupra celulelor canceroase. Astăzi se știe că au activitate mult mai largă, inclusiv asupra celulelor infectate viral. Acțiunea litică asupra celulelor infectate viral, ca și asupra celulelor tumorale este datorată secreției de proteaze numite perforine și granzime. Celulele NK sunt "armate" de interferoni. Interferonul gamma și perforinele sunt molecule cheie pentru supravegherea imunologică a genezei tumorilor. Alte citokine au rol inhibitor asupra activității celulelor NK. De exemplu, interleukina 10 este cunoscută ca "factor de inhibiție a sintezei interferonului gamma".

Sinteză

Răspunsul imun înnăscut este faza inițială a apărării imune, eficientă împotriva unei game variate de virusuri. Răspunsul imun înnăscut influențează și răspunsul imun adaptativ, care este însă restrâns numai la virusul care a inițiat infecția. Virusurile au dezvoltat o serie

de strategii care blochează răspunsul imun înăscut, asigurând micronișa necesară replicării virale.

BIBLIOGRAFIE

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54-60.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:499-511.

IMUNITATEA ÎN VIROZE

De reținut:

Particularitățile răspunsului imun în viroze sunt determinate de complexitatea și modul de prezentare al antigenelor la suprafața virionilor sau celulelor infectate viral. În general, răspunsul imun celular prevalează în viroze datorită modului de procesare intracelulară al antigenelor virale. Intervenția complexului major de histocompatibilitate este demonstrată de fenomenul dublei restricții Zinkernagel și Doherty. Mecanisme imune mediate celular (alături de seroneutralizare) asigură clearance-ul virionilor liberi sau al celulelor infectate viral: citotoxicitate directă, citotoxicitate dependentă de anticorpi cu sau fără participarea complementului etc.

INTRODUCERE

Gazda confruntată cu infecția virală mobilizează mecanisme de apărare nespecifică și specifică. Rezistența naturală (tabelul 9.1) este nespecifică, ceea ce înseamnă că mecanismele efectorii sunt operante în infecții cu orice virus și, de asemenea, în infecții bacteriene, fungice, cu protozoare etc. Rezistența de tip imun este specifică, adică limitată la o anumită familie, tip - subtip de virus. Este cunoscut că cele mai multe mecanisme ale rezistenței naturale sunt augmentate de factori imuni (de exemplu, fenomenul de opsonizare - de augmentare a fagocitării bacteriilor cuplate cu anticorpi specifici).

Răspunsul imun este rezultatul stimulării celulelor imunocompetente de agenți străini (nonsell). Definirea celulelor imunocompetente se face în funcție de o serie de determinanți de la suprafața lor (antigene de citodiferențiere - CD - *cluster designation*), care leagă specific reagenți particolari (exemplu: anticorpi monoclonali specifici). Pentru o imagine de ansamblu este suficientă considerarea următoarelor celule implicate în răspunsul imun:

- limfocitele T (timus derivate) cu subseturi alcătuite din celule T helper (T_H) și celule citotoxice/supresoare ($T_{C/S}$);
- limfocitele B (derivate din măduva osoasă) care, diferențiindu-se în plasmocite, secretă anticorpi;
- macrofagele sau, mai bine zis, sistemul fagocitar mononuclear constituit din monocite, macrofage tisulare (fixe), precursori etc.

TABELUL 9.1

MECANISME DE APĂRARE ALE GAZDEI CONFRUNTATE CU INFECȚIA VIRALĂ

Felul rezistenței	Mecanisme	Exemple
Rezistența nespecifică	Bariere fizice	Piele, mucoase, cili
	Bariere chimice	Acizi grași, pH acid, mucus
	Factori umorali	Lizozim, complement, interferoni
	Proteine de fază acută	Proteina C reactivă, Beta ₂ -microglobulina, neopterină
	Factori celulari	Flora asociată, celule NK
Rezistența specifică (dobândită prin boală)	Imunitate umorală	Anticorpi
	Imunitate celulară	Citotoxicitate mediată celular, macrofage activate etc.
Rezistența specifică (indusă artificial)	Imunizare activă	Vaccinare
	Imunizare pasivă	Seroprofilaxie

Există două verigi efectorii ale răspunsului imun: umorală și celulară.

Anticorprii - sunt imunoglobuline specifice sintetizate de plasmocite și reprezintă efectorii umorali. Rolul anticorpilor în limitarea și vindecarea infecțiilor virale depinde de clasa de imunoglobuline (Ig) cărora le aparțin.

Limfocitele citotoxice/supresoare (celulele $T_{C/S}$) sunt efectorii citolizei imune, asistată sau nu de anticorpi și complement. Cele două verigi, umorală și celulară, acționează complementar și sinergic. Evaluarea efectorilor răspunsului imun este sintetizată în tabelul 9.11.

RĂSPUNSUL IMUN PRIMAR ȘI SECUNDAR

Când un subiect este confruntat cu un antigen (virus, bacterie, toxină etc.) se produce o reacție imună care mobilizează efectorii celulari și umorali. La primul contact cu antigenul ponderea celor 2 categorii de efectori variază în funcție de felul antigenului și modul în care acesta este prezentat celulelor imunocompetente. La contactul secundar (booster sau rapel), tipul de răspuns imun este dependent în mare măsură de rezultatul primului stimul antigenic, de răspunsul primar (fig. 9.1 și 9.2).

TABELUL 9.II

EVALUAREA COMPONENTELOR CELULARĂ ȘI UMORALĂ ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Efectorii, celulari					
Celule	Limfocite B		Limfocite T		Fagocite
Număr normal x 10 ⁹ /l	0-3		Total: 1-2,5	Monocite 0,15-0,6	
			TCD4: 0,5-0,6	Neutrofile: 3-5,5	
			TCD8: 0,8-0,9	Eozinofile: 0,05-0,25	
			CD8/CD4 = 1,5	Bazofile: 0,02	
Metode de estimare a funcției in vivo	Nivel seric Ig		Proliferarea lim- focitelor la PHA		
	Titru anticorpi				
Metode de estimare a funcției in vitro	Anticorpi induși de mitogeni - EIA		ELISPOT		Fagocitoza
Efectorii umorali					
Componenta	IgG	IgM	IgA	IgE	Complement CH ₅₀
Valori normale	600-1 400 mg/dl	4 0 - 3 4 5 mg/dl	6 0 - 3 8 0 mg/dl	0-200 UI	125-300 UI

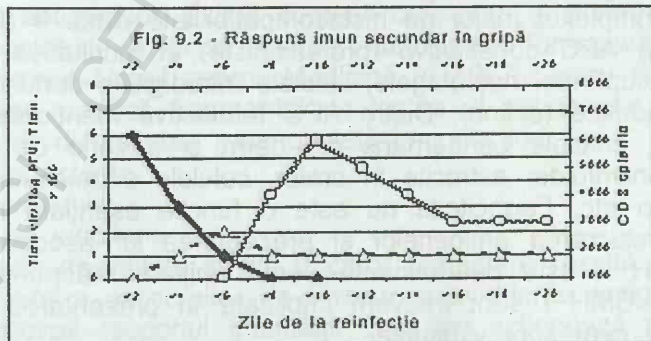
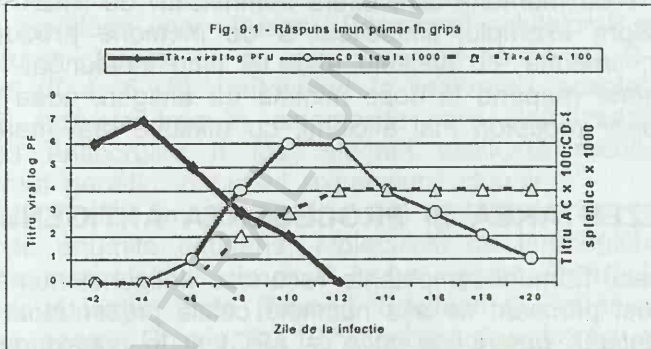


Fig 9.1-9.2. Răspunsul imun primar și secundar în gripă. Principalii contributivi la vindecare și scăderea titrului viral sunt anticorpii și limfocitele sensibilizate CD8⁺ (cito-toxice). Titrul viral scade rapid în reinfecție chiar dacă noua tulpină cross reacționează parțial cu cea veche. A se nota pe axa Y secundară diferențele de valoare PFU - titrul viral în plaque forming units.

Răspunsul imun primar evoluează în patru faze: de latență (lag), de creștere logaritmică (log), de platou și de declin. În general, răspunsul imun primar este timpuriu, puțin specific și pasager.

Răspunsul imun secundar are câteva particularități în raport cu ceea ce s-a obținut la primul stimul:

a. faza de lag este mult scurtată, iar durata platoului și a declinului prelungite;

b. titrul anticorpilor este net superior (de peste 10 ori în faza de platou) în raport cu titrul înregistrat în răspunsul imun primar;

c. clasele de Ig la care aparțin anticorpii sunt de tip IgM în răspunsul imun primar și IgG în răspunsul secundar;

d. afinitatea anticorpilor este crescută în cursul răspunsului secundar, ceea ce s-a numit "maturarea afinității".

Capacitatea organismului de a edifica un răspuns de tip secundar se bazează pe "memoria imunologică", acest fenomen constituind rațiunea schemelor de imunizare (vezi capitolul 10).

Baza celulară a memoriei imunologice este expansiunea unei populații de limfocite sensibilizate în raport cu antigenul. Există limfocite B și T de memorie care diferă semnificativ de limfocitele nesensibilizate. Spre exemplu, limfocitele B de memorie produc anticorpi de tip IgG, timpuriu, cu afinitate mare și timp îndelungat. Limfocitele T de memorie răspund la doze minime de antigen, ceea ce implică existența unor receptori mai eficienți, cu afinitate mai mare.

PREZENTAREA ȘI PROCESAREA ANTIGENULUI

Celulele T imunocompetente recunosc antigenul numai după ce acesta a fost procesat de așa numitele celule prezentatoare ale antigenului ("*antigen presenting cells*" = APC) și în conexiune cu molecule din complexul major de histocompatibilitate clasa II (CMH II).

Există APC constitutive (profesioniste) și facultative. În primul grup sunt cuprinse macrofagele, celulele interdigitale dendritice și foliculare dendritice (splina). Dintre APC facultative menționăm celulele B activate, celulele Langerhans din derm și o serie de celule din țesuturi nonlimfoide: astrocite în creier, celulele endoteliului vascular, fibroblastele etc. Fagocitoza nu este o funcție esențială a APC, în schimb, prelucrarea antigenelor și prezentarea lor asociat cu moleculele CMH II este determinantă pentru inițierea răspunsului imun. Moleculele CMH I sunt frecvent implicate în prezentarea paraziților intracelulari cum sunt virusurile.

Simultan cu procesarea antigenului, celulele APC sunt implicate în sinteza interleukinei 1 (IL-1) care activează limfocitele. IL-1 este produsă de multe tipuri de celule ca răspuns la traume mecanice, infecții, contact cu antigene etc. IL-1 acționează asupra limfocitelor B

și T (potențând răspunsul lor la acțiunea altor limfokine), asupra celulelor NK (*natural killer*) și asupra macrofagelor (fie direct, fie mediat prin alte limfokine sau prin interferonul gamma).

În general, IL-1 este sintetizată în cursul răspunsului inflamator, influențând și producția altor citokine, ca TNF (*tumor necrosis factor*) sau diferiți factori stimulatori ai formării coloniilor.

Celulele T expun receptori pentru IL-2 sau factorul de creștere a celulelor T care se secretă autocrin. IL-2 activează și celelalte celule imunocompetente și promovează eliberarea altor mediatori, ca interferonul gamma (IFN gamma).

IFN gamma are multiple funcții imunoreglatoare, între care promovarea expresiei glicoproteinelor CMH II. Funcțiile sale, antivirală, antiproliferativă și de stimulare a celulelor NK, sunt mai puțin exprimate decât la celelalte specii de interferoni.

RĂSPUNSUL IMUN UMORAL

Activarea celulelor B are loc și în absența celulelor T cu așa numitele antigene T independente (antigene polimerizate, cum sunt capsida și anvelopa unor virusuri). Răspunsul celulelor B constând în sinteza tuturor claselor de Ig este urmarea cooperării B-T, anumite interleukine (IL-4, 5, 6) contribuind la realizarea acestei cooperări. Celulele B activate trec în plasmocite care sintetizează anticorpi. Diversitatea anticorpilor a fost elegant explicată recunoscându-se determinismul genetic în cursul expansiunii clonale.

Anticorpii sunt imunoglobuline (Ig) sintetizate de limfocitele B stimulate de anumite antigene. Moleculele de imunoglobuline (IgG) sunt heterodimeri alcătuiți din două lanțuri ușoare (*light*), lambda sau kappa și două lanțuri grele (*heavy*). Edelman și Porter au luat premiul Nobel pentru Chimie în 1972 pentru descifrarea structurii pe domenii a anticorpilor. Există domenii constante și domenii variabile. Ultimele contribuie la recunoașterea imunologică. Tonegawa a fost distins cu premiul Nobel pentru Medicină în 1987 pentru descoperirea genelor care codifică fragmentul de legare al antigenului - Fab - și care asigură diversitatea recunoașterii imunologice:

C - constante.

V - variabile.

J - de joncțiune.

D - de diversitate și din a căror rearanjare rezultă capacitatea practic infinită a anticorpilor de-a recunoaște diferite antigene.

Anticorpii (suportul imunității umorale) acționează atât asupra virionilor liberi extracelulari, cât și asupra celulelor infectate viral.

Acțiunea asupra virionilor liberi este virus-neutralizantă. Legarea structurilor superficiale (anvelopă, capsidă) ale virionilor produce modificări conformaționale și împiedică adsorbția și internalizarea.

În general, protecția unui organism față de infecție este datorată unei concentrații mari a anticorpilor serici (IgG) sau la nivelul mucoaselor (IgA). Există o supradimensionare a răspunsului în anticorpi, încât diluții de 1/100 ale serului imun rețin încă proprietățile virus-neutralizante.

Nu toți anticorpii sunt neutralizanți. Unii leagă structuri virale inserate în membrana celulelor infectate și participă la liza acestora (cu sau fără participarea complementului). În multe viroze se sintetizează și anticorpi nonneutralizanți, care contribuie la formarea unor complexe imune (virus - anticorp) în care virusul reține capacitatea infectantă. În fine, există, paradoxal, și anticorpi "sensibilizatori", care pot exagera manifestările infecției.

Sursa anticorpilor este reprezentată de **limfocitele B** (provenite din măduva osoasă). Ele recunosc antigenele virale, proliferază clonal la contactele secundare cu aceste antigene, se transformă în plasmocite care sintetizează și secretă anticorpi.

O fracție din limfocitele B se reînnoiește cu un timp de înjumătățire foarte lung - ele sunt **limfocitele de memorie**. Acestea asigură apărarea promptă a organismului imun la contactele ulterioare cu același virus. Limfocitele B de memorie expandează clonal la provocările virale succesive și asigură sinteza rapidă a unor concentrații mari de anticorpi ("booster") care contribuie la protecția eficientă a subiecților imuni.

Rolul protector al anticorpilor se manifestă și în facilitarea efectelor rezistenței nespecifice (de exemplu, prin fenomenul de opsonizare, care înseamnă fagocitarea mai eficientă a virusurilor cuplate cu anticorpi). De asemenea, anticorpii cresc eficiența răspunsului imun celular.

Rolul anticorpilor în limitarea sau vindecarea infecțiilor virale (tabelul 9.III) depinde de clasele de imunoglobuline cărora le aparțin:

- anticorpii de tip IgM (19S) se sintetizează timpuriu în infecție și în mod normal dispar din sânge după primele 3-4 săptămâni de boală. Persistența lor indică cronicizarea infecției virale;

- anticorpii de tip IgG (7S) încep să fie sintetizați din a 2-a săptămână de boală și sinteza lor continuă ani după infecție. Ei protejează subiectul de reinfecția cu același virus;

- anticorpii de tip IgA (11S) caracterizează răspunsul imun la nivelul mucoaselor, fiind suportul rezistenței locale în tractul respirator și gastrointestinal.

Sinteza anticorpilor influențează decisiv - uneori - evoluția virozelor. În infecțiile viremice, în care virionii circulă liber în plasmă, anticorpii neutralizează infectivitatea. În schimb, în cazul în care virionii se multiplică în limfocite sau macrofage, acțiunea anticorpilor este minimă. Anticorpii de tip IgG au rol critic în rezistența la infecții a nou-născutului în primele 6-9 luni de viață pentru că, străbatând pla-

centa, anticorpii materni asigură protecția copilului la infecții virale curențe. Anticorpii de tip IgM nu străbat placenta și existența lor semnalează replicarea activă a virusului în organismul copilului și, deci, infecția virală congenitală. Acțiunea virus-neutralizantă a anticorpilor este operantă în fazele inițiale ale ciclului replicativ: adsorbție, penetrare, decapsidare. Anticorpii direcționați împotriva unor situsuri critice sunt cei mai eficienți (exemplu, anticorpii antihemaglutinină virală). Ținând seama de mozaicul de antigene prezent la suprafața virionilor, unii anticorpi cu specificitate pentru situsuri noncritice pot interfera acțiunea primilor. La fel, acțiunea anticorpilor cu specificitate pentru componentele interne ale virionilor este nerelevantă din punctul de vedere al protecției gazdei. Complementul acționează solidar cu anticorpii în neutralizare, fie lizând anvelopa virală, fie alăturându-se complexului virus - anticorpi. Anticorpii și complementul pot liza celule infectate viral care exprimă antigene virus codificate la nivelul membranei celulare. Călea alternativă de activare a complementului amplifică de regulă secvența litică inițială pe calea clasică. Efectul protector al anticorpilor a fost apreciat la agammaglobulinemici sau la șoarecii nuzi (lipsiți de efectorii imunității celulare) cărora anticorpii li se administrează artificial.

TABELUL 9.III

EFECTELE ANTIVIRALE ALE ANTICORPILOR

<i>Efectori imuni</i>	<i>Avantaje</i>	<i>Dezavantaje</i>
Anticorpi	Seroneutralizare	Promovează persistența
Anticorpi + antigen	Mitigarea simptomatologiei	Selecția mutantelor nonneutralizabile
Anticorpi + complement	Liză-neutralizare	Promovează inflamația
Anticorpi + antigen ± cale clasică complement	Complexe imune	Infecție a fagocitelor
Anticorpi + antigen ± cale alternativă complement	Clearance via receptori C ₃ , F _c	Noi receptori virali pe celule infectate

În general, în viroze, răspunsul imun celular prevalează asupra celui umoral, subiecții agammaglobulinemici vindecându-se în urma infecțiilor virale. Totuși, seroprofilaxia administrată timpuriu își are locul său în protecția gazdei.

COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (CMH) ȘI IMUNITATEA ANTIVIRALĂ

Genele CMH codifică proteine a căror funcție este de a furniza limfocitelor T un context adecvat pentru recunoașterea antigenelor

nonself. Segmentul cromozomial pentru CMH este situat pe cromozomul 6 la om și reprezintă în jur de 1:3 000 din genomul uman, adică între 1-3 centiMorgani (1 cM = 1 000 kbaze). În acest segment se află și gene care nu aparțin CMH (de exemplu, cele pentru complement), după cum elemente din CMH sunt codificate de alte regiuni ale genomului uman. Moleculele CMH se comportă ca receptori de slabă afinitate pentru antigene. Compararea proprietăților lor cu ale altor două clase de substanțe care cuplează antigenele - imunoglobulinele și receptorul celulelor T (TcR) - este redată în tabelul 9.IV.

TABELUL 9.IV

COMPARAREA UNOR CLASE DE RECEPTORI PENTRU ANTIGENE

Caracteristica	CMH	Ig	TcR
Situsuri per moleculă	1	2 (IgG); 4 (IgA) 10 (IgM)	1
Afinitate (kd)	10^{-5} - 10^{-6} mol/l	10^{-9} , 10^{-11} mol/l	?
Viteză asociere	Lentă (48 ore)	Rapidă	
Viteză disociere	Lentă	Lentă	
Diversitate (rearanjări)	Nu	Da	Da
Număr alele per subiect	20	$>10^6$	$>10^6$
Specificitate	Mică	Precisă	Precisă
Isotipie	3 molecule	Ig G, M, A, D, E	T alfa-beta sau T gamma-delta

Deci, funcția CMH este de prezentare a antigenelor procesate anterior de celulele APC, o funcție esențială în funcționarea sistemului imun al vertebratelor. Aceasta se realizează prin următoarele mecanisme:

- selecționarea limfocitelor capabile de a recunoaște moleculele CMH clasa I (limfocite CD8 pozitive), respectiv, moleculele CMH clasa a II-a (limfocite CD4 pozitive);
- prezentarea peptidelor rezultate din procesarea antigenelor străine receptorului celulelor T (TcR);
- eliminarea celulelor TcR autoreactive.

Există mai multe clase de antigene codificate de genele CMH, dar numai două au o importanță decisivă în apărarea antiinfecțioasă și antitumorală: clasele I și II.

Antigenele clasei I CMH au o distribuție ubicuitară, dar cu diferențe cantitative de la un țesut la altul. Limfocitele au o mare densitate de antigene de clasa I pe membrana celulară. Structura primară a acestor antigene cuprinde un lanț greu glicoproteic trans-

membranar asociat cu o moleculă de beta₂-microglobulină. Lanțul greu este organizat pe domenii asemănător imunoglobulinelor. Domeniile alfa₁ și alfa₂ sunt implicate în crearea fantei de prezentare a peptidelor străine.

Antigenele clasei a II-a CMH sunt exprimate numai pe limfocitele B și pe celulele din linia monocite - macrofage. De notat că, deși absente pe limfocitele T în repaus, antigenelor clasei a II-a CMH sunt exprimate de celulele T activate. De asemenea, interferonul induce expresia ambelor clase de antigene CMH. Structura primară a CMH clasa a II-a cuprinde două lanțuri (alfa și beta) glicoproteice transmembranare. Probabil un al treilea lanț este necesar solidarizării primelor și expresiei fantei de prezentare a peptidelor străine.

O caracteristică importantă a antigenelor CMH este polimorfismul, respectiv, prezența unei variabilități structurale de la un individ la altul.

În imunitatea antivirală intervenția CMH este demonstrată de fenomenul dublei restricții Zinkernagel și Doherty. Acești autori au primit premiul Nobel pentru că au stabilit că splenocitele animalelor imunizate (limfocitele citotoxice) recunosc și lizează celulele infectate viral (celulele țintă) în mod specific, în funcție de două elemente: identificarea CMH al țintei și a antigenelor virale expuse la suprafața celulelor infectate. Acest fenomen derivă din existența complexului trimolecular:

CMH + antigen procesat (peptide) + TcR (T cell receptor).

În plus, controlul genetic al răspunsului imun este condiționat de existența genelor Ir (ale răspunsului imun) legate de CMH. Aceste gene participă la fenomenul de corecunoaștere. Cooperarea între limfocitele T helper și T citotoxice ca și între țintă și celulele prezentatoare de antigen (APC) depinde de recunoașterea CMH.

Statusul genetic al unui individ în ceea ce privește calitatea de "responder" sau "nonresponder" la un anumit antigen este condiționată de:

- selecția determinantului, respectiv, asocierea peptid (antigen) - CMH;
- repertoriul limfocitelor T (capabile sau nu de a recunoaște complexul peptid - CMH propriu).

Asocierea CMH - peptid este determinată de structura lor primară, secundară, terțiară. În general, situsul de legare (fanta) CMH se comportă ca un receptor de slabă afinitate pentru peptidele rezultate din procesarea antigenelor.

Repertoriul limfocitelor T al unui individ este influențat de propriul CMH în cursul maturării limfocitelor în timus. O selecție pozitivă permite dezvoltarea limfocitelor T cu un TcR capabil să cupleze mole-

culele CMH de clasa I sau a II-a autoloage cu o afinitate moderată. O selecție negativă elimină limfocitele T cu un TcR care recunoaște selful.

Moleculele CMH (clasele I și II), imunoglobulinele, TcR etc. fac parte dintr-o singură familie supergenică de molecule derivate dintr-un ancestor comun: receptorul primordial al suprafeței celulare.

RĂSPUNSUL IMUN CELULAR

Următoarele celule cooperează în răspunsul imun celular:

- celulele foliculare dendritice (CFD);
- macrofagele (atât cele circulante, cât și cele intratisulare);
- limfocitele T helper (CD4⁺);
- limfocitele T citotoxic/supresoare (CD8⁺).

Particularitatea cea mai importantă a imunității în viroze este rolul preponderent al imunității celulare. Există unele anomalii congenitale ale răspunsului imun care se traduc fie prin lipsa sintezei anticorpilor (agammaglobulinemie), fie prin lipsa unor celule imunocompetente. Copiii cu agammaglobulinemie pot vindeca virozele, pentru că păstrează acțiunea celulelor imunocompetente. Cei cu deficiențe ale răspunsului celular fac forme letale ale infecțiilor virale în ciuda existenței anticorpilor.

O altă particularitate a imunității în viroze constă în modalitatea de recunoaștere a antigenelor virale. Proteinele virale (mai ales cele din anvelopă sau capsidă) nu sunt recunoscute global, ci după clivarea lor în peptide. Unele din aceste peptide au un rol determinant în protecție și sunt denumite *epitopi dominanți*. Mecanisme enzimatice complexe cantonate pe macrofage asigură nu numai decuparea peptidelor, dar și prezentarea lor pe structuri membranale care alcătuiesc **complexul major de histocompatibilitate (CMH)**. Simplificând, există două clase CMH:

- clasa I, prezentă atât pe **macrofage**, cât și pe toate celulele somatice (cu excepția hematiilor care sunt anucleate);
- clasa a II-a, prezentă numai pe macrofage și pe limfocitele B și T activate.

CFD sunt celule derivate din măduva osoasă prezente în țesuturi nonlimfoide și care au capacitatea de a captura și procesa antigenele. Odată activate de contactul cu microorganisme patogene, CFD capătă proprietatea de a migra în organele limfoide secundare și de a secreta interferon gamma. Capacitatea migratorie face din CFD cele mai importante celule prezentatoare de antigen, net superioare macrofagelor rezidente în țesuturi.

Limfocitele T (timus derivate) recunosc epitopii virali în mod specific prin receptorul celulelor T (TcR), care, principal, are o structură similară imunoglobulinelor (cu domenii constante și variabile).

Recunoașterea se face (mnemotehnic) potrivit "*regulii produsului constant*":

- limfocitele T helper (CD4⁺) recunosc peptidele prezentate pe CMH clasă a II-a ($4 \times 2 = 8$);
- limfocitele T citotoxice (CD8⁺) recunosc peptidele prezentate pe CMH clasa I ($8 \times 1 = 8$).

Activitatea antivirală a limfocitelor CD8⁺ constă în liza specifică a celulelor infectate cu virusul cu care au fost activate sau "educate" aceste celule în cursul răspunsului primar.

În 1996 premiul Nobel pentru Medicină a fost acordat lui Doherty și Zinkernagel pentru demonstrarea specificității răspunsului imun mediat celular în viroze. Ei au propus și argumentat modelul "recunoașterii selfului alterat". Un singur receptor situat pe limfocitele T (TcR) recunoaște simultan antigenele virale procesate (peptidele) și cele de histocompatibilitate. Lanțuri peptidice scurte (9-11 aminoacizi pentru CMH I, sub 21-23 de aminoacizi pentru CMH II) rezultate din procesarea intracelulară (în celulele prezentatoare de antigen) a antigenelor virale sunt expuse într-o nișă (fantă) formată din lanțurile de proteine care alcătuiesc CMH.

Activitatea celulelor T_{C/S} este legată de aviditatea între cele trei componente ale **trepiedului critic** pentru imunitatea virală: TcR - peptid - CMH.

Activitatea antivirală a celulelor T_H este fie directă (rar citoliză), fie mediată de sinteza unor citokine care asistă limfocitele B și T_{C/S}.

Există două subseturi de celule T_H caracterizate de profilul interleukinelor sintetizate:

- T_{H1} care produc mai ales interferon gamma și asigură protecția împotriva patogenilor intracelulari (nu numai virusuri, ci și bacterii, ca mycobacterium tuberculosis etc.).
- T_{H2} care produc mai ales IL-4, IL-5 și IL-13, importante pentru protecția împotriva helminților.

Celulele helper T_H nediferențiate sunt "educate" de citokine spre specializări cu funcții importante în apărarea împotriva agenților patogeni intracelulari (virusuri, dar și bacterii, precum bacilul Koch etc.) sau împotriva celulelor canceroase. În plus, limfocitele T helper intervin în patogenia bolilor autoimune, alergiilor sau a imunosupresiei. Practic, există două direcții majore de specializare pentru limfocitele T helper:

- în apărarea antivirală, prin 2 subseturi (T_{H1} și T_{H2}) care se contrabalansează;

• în apărarea în cancer și în inflamație, prin alte 2 subsaturi (T_{H17} și $T_{reglatoare}$) (fig. 9.3).

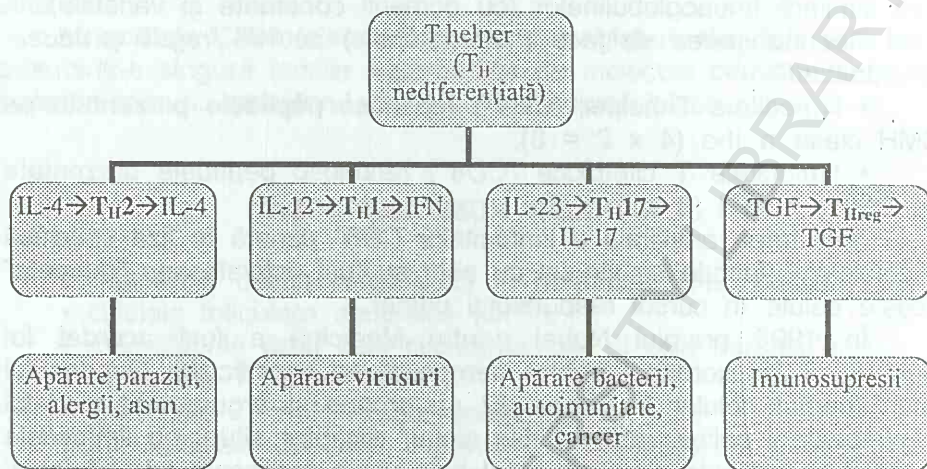


Fig. 9.3. Specializările limfocitelor T helper.

Fiecare subset este indus de o anumită citokină (interleukină), care va fi și secretată de celula diferențiată.

Limfocitele B, T_H și $T_{C/S}$ nu au funcții suprapuse și o serie de studii au demonstrat rolul lor complementar. De exemplu, transferul unui subset sau al unei combinații din numai două subsaturi este insuficient pentru asigurarea protecției.

La fel ca și în cazul limfocitelor B de memorie există **limfocite $T_{C/S}$ de memorie**, cu viață lungă. Acestea din urmă pot fi "recrutate" cu mare promptitudine din compartimentele de memorie și pot limita eficient orice reinfecție virală cu un virus deja cunoscut organismului. Vârful răspunsului imun celular este în general la 14 zile postinfecție, corelând cu scăderea dramatică a încărcării virale. Persistența limfocitelor de memorie asigură diminuarea severității simptomelor în cursul reinfecției. Intervenția celulelor de memorie se desfășoară în mai multe faze:

- Prima fază este mediată de limfocitele T de memorie. Aceste celule răspund la primele semne de reinfecție când încărcarea virală este foarte mică. Ele nu proliferază clonal, dar pot sintetiza citokine și limita diseminarea reinfecției.

- A doua fază este mediată de macrofage și limfocitele T helper care procesează și prezintă antigenele virale limfocitelor citotoxice și limfocitelor de memorie.

- A treia fază este atributul celulelor de memorie mobilizate din ganglionii locoregionali. Aceste celule proliferază clonal în organele limfoide în urma contactului cu antigenele virale. Ele sunt recrutate la sediul infecției numai după ce au proliferat circa 5 zile în organele limfoide.

Răspunsul imun poate fi eludat de virusuri care au dezvoltat mai multe strategii de șuntare a efectorilor. Între acestea menționăm:

- Modificarea antigenicității prin selecția tulpinilor sau quasi-speciilor virale nonneutralizate (vezi gripa sau hepatita C).
- Supresia unor citokine sau competiția cu receptorii pentru citokine (vezi virusul vaccinal).
- Simularea unor antigene proprii gazdei (selfului).
- Infecția și liza unor celule cheie ale răspunsului imun (vezi HIV).
- Latența virală (vezi herpesvirusuri).

Reacțiile imune mediate celular sunt de citotoxicitate sau de citotoxicitate dependentă de anticorpi cu sau fără complement. Celulele T citotoxice acționează numai în cazul similitudinii moleculelor CMH ale efectorului și țintei (restricția CMH).

În afara celulelor TC în apărarea celulară antivirală sunt implicate celulele K (*killer*), care au receptori Fc, și NK (*natural killer*), care acționează independent de restricția CMH.

Celulele NK, definite inițial numai funcțional ca efectori ai citotoxicității nespecifice, eficientă fără restricția CMH, cuprind mai multe populații celulare. Astfel: limfocitele granulare mari (1), celulele LAK sau celulele killer activate de concentrații mari de limfokine (2) și celulele cu ascendență diferită care apar în reacția limfocitară mixtă (3) sunt toate suportul activității NK. În afara altor proprietăți imunomodulatorii, toate speciile de interferon stimulează direct activitatea NK.

Sinteză

Există efectori imuni succesivi care asigură rezistența gazdei în diferite faze ale unei infecții virale generalizate. Prima linie de apărare o reprezintă interferonul și celulele NK. În faza viremică, anticorpilor constituie mecanismul efector principal. Pentru virusurile care se replică numai la nivelul mucoaselor, IgA secretorii asigură virus-neutralizarea. Virusul intracelular, la nivelul organului țintă sau atașat elementelor celulare din sânge, este neutralizat de celule sensibilizate T_C, K etc., acționând solidar cu anticorpilor și complementul. Mecanisme celulare similare asigură și liza celulelor infectate viral care, uneori, prin amploare, determină leziuni mai ample decât infecția originală.

BIBLIOGRAFIE

- Woodland DL, Randall TD. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. *Semin. Immunol.* 2004;16:163-70.
- Seth RB, Sun LJ, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Research* 2006;16:141-147.

INTERFERONI

De reținut:

Există mai multe tipuri de interferon, dar trei sunt importante în clinică: leucocitar (alfa), fibroblastic (beta) și imun (gamma). Ele sunt distincte antigenic, structural și prin proprietățile fizico-chimice și biologice. Efectele biologice apar în urma legării de receptori specifici pentru alfa/beta, pe de o parte, și gamma, pe de altă parte. Efectul antiviral este speci-specific, dar virus nespecific. Mecanismele inhibiției virale sunt multiple, diferind de la un virus la altul.

INTERFERENȚA

Multiplicarea unui virus inhibă adeseori replicarea unui al doilea virus care infectează aceeași gazdă. Acest fenomen a fost denumit interferență și explicat în mai multe situații:

- **interferența omoloagă** sau autointerferența care se produce în infecții cu inocule foarte concentrate și este urmarea generării de particule interferent-defective (vezi capitolul 6);

- **interferența heteroloagă**, între virusuri diferite care infectează, de regulă, succesiv aceeași gazdă. În cazul în care cele două virusuri competiționează pentru aceleași verigi ale ciclului replicativ (receptori, enzime etc.), interferența este heteroloagă **intrinsecă**. Dacă multiplicarea primului virus (interferent) generează sinteza unor proteine solubile (interferoni) care inhibă replicarea virusului interferat fenomenul este numit interferență **extrinsecă**.

DEFINIȚIA INTERFERONULUI

Interferonul a fost descoperit de Isaacs și Lindenmann printr-un experiment de referință în biologie. Inoculând pe ouăle de găină embrionate un virus gripal inactivat (termic sau cu ultraviolete) se obține inhibarea replicării virusului gripal neinactivat, inoculat ulterior.

Luând supernatantul celulelor inoculate cu virus gripal inactivat autorii au constatat că acesta conține o glicoproteină capabilă să protejeze alte celule de orice infecție virală consecutivă. Descoperirea IFN a deschis drumul înțelegerii comunicării intercelulare prin peptide sau glicoproteine și a pregătit terenul pentru descoperirea citokinelor, factorilor de creștere și a reglării prin limfokine a răspunsului imun. IFN reprezintă o familie de glicoproteine cu efecte antivirale, antitumorale și imunomodulatorii. IFN este specific de specie (acțiunea IFN uman este maximă pe celule umane), dar este nespecific față de virus, respectiv, tratamentul cu interferon induce rezistența celulelor față de orice virus. Efectul IFN este manifest când celulele sunt pretratate 18-24 ore înainte de inoculul viral. Pentru a atribui unui preparat calitatea de IFN el trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- activitate specifică de specie,
- activitate calitativ nespecifică în raport cu virusul inhibat dar cu intensitatea efectului antiviral variabilă în funcție de virus (mai pronunțată pe ribovirusuri),
- structura chimică glicopeptidică,
- activitate antivirală mediată de derepresarea unor gene care sintetizează efectorii antivirali,
- sinteza dependentă de funcțiile celulare de transcriere (inhibată de actinomicina D) și traducere (inhibată de cicloheximidă),
- acțiune dependentă de cuplarea unor receptori celulari pentru IFN și inhibată de anticorpi antiinterferon,
- acțiune de scurtă durată (ore) urmată de instalarea unei stări refractare la aplicarea unor doze ulterioare de interferon.

TABELUL 10.1

UNELE CARACTERISTICI ALE INTERFERONILOR UMANI

Caracteristica	IFN alfa	IFN beta	IFN gamma
Număr de gene	14	2	1
Prezența intronilor	NU	NU	DA
Localizare cromozomială	CROMOZOM 9	2,9	12
Carbohidrați în moleculă	NU	DA	DA
Stabilitate la pH 2	DA	NU	NU

TIPURI DE INTERFERON

După structura moleculară și antigenicitate se disting trei grupe de IFN (tabelul 10.1). IFN alfa și beta sunt proteine alcătuite din 166 de aminoacizi codificați de o genă localizată pe cromozomul 9. Inductorii lor sunt virusurile, câteva bacterii sau moleculele ARNds.

IFN gamma are numai 146 de aminoacizi codificați de o genă localizată pe cromozomul 12. Acest tip este numit și IFN imun, pentru că este produs de limfocitele T ca răspuns la un stimul mitogen. Receptorii pentru IFN gamma sunt distincți de tipul comun de receptori pentru IFN alfa și beta. După interacțiunea IFN/receptor, ligandul este internalizat și, în funcție de celulă, degradat sau nu. Cuplarea receptorilor induce transcrierea mai multor gene celulare, anterior represate, și sinteza de noi proteine celulare. Pentru acțiunea antivirală a IFN două proteine prezintă un interes particular: o protein kinază care fosforilează subunitatea alfa a factorului de inițiere a sintezei proteice (eIF 2) și 2'5'-oligoadenilat sintetaza, enzimă cu activitate endoribonucleazică care degradează ARNm. Este bine stabilit că inhibiția multiplicării virale prin IFN survine la cel puțin două nivele: inhibarea traducerii și degradarea preferențială a ARNm viral. IFN fac parte din rețeaua citokinelor cu care acționează concertat în expresia diverselor efecte biologice. Cele mai importante acțiuni biologice ale IFN sunt:

1. acțiunea antivirală nespecifică, acțiuni inhibitorii pe alți paraziți intracelulari;
2. inducția secreției mai multor citokine: IL-1, TNF, factori de stimulare ai precursorilor granulocitari, inclusiv acțiunea de promovare a propriei activități în urma administrării unor doze mici cu câteva ore înaintea dozei terapeutice (efect de "priming"),
3. inhibarea creșterii celulelor normale și transformate,
4. influențarea diferențierii celulare,
5. creșterea expresiei antigenelor CMH din clasele I și a II-a,
6. creșterea activității celulelor NK,
7. creșterea proliferării și diferențierii limfocitelor B și a sintezei IgG,
8. activarea macrofagelor,
9. sporirea numărului de receptori pentru alte citokine și pentru porțiunea Fc a IgG (mai ales IFN gama).

În particular, IFN gamma modulează expresia receptorilor pentru TNF (*tumor necrosis factor*) pe celulele mielomonocitare umane. În cele mai multe cazuri acest efect este sinergic cu inhibiția diviziunii celulelor tumorale. Efectul antitumoral al IFN gamma a fost intens studiat, concluzionându-se că în final se induce biosinteza oxidului azotic (NO) plecând de la arginină. NO este o moleculă efectoare a citotoxicității antitumorale a macrofagelor activate.

Genele pentru IFN nu sunt continuu exprimate. Inductorii de IFN (mai ales ribovirusurile, alte specii de ARNs naturali sau sintetici, mitogenii, lectinele etc.) au comun faptul că determină transcrierea genelor pentru IFN, generând speciile de ARNm care codifică diferitele tipuri de IFN.

RECEPTORII PENTRU IFN

Este unanim acceptat faptul că acțiunile IFN sunt consecința legării de receptori specifici prezenți pe suprafața celulelor țintă. Microinjecția intracelulară de IFN care șuntează membrana nu determină efectele biologice scontate. Receptorii pentru IFN alfa/beta sunt codificați de o genă situată pe cromozomul 21, iar pentru IFN gamma de o genă situată pe cromozomul 6. Celulele cu trisomie pentru cromozomul 21 sunt mai sensibile la IFN alfa/beta. Receptorii pentru IFN sunt prezenți pe toate celulele organismului, dar cu densități diferite. Speciile de IFN recombinant recunosc aceiași receptori ca și IFN naturali (tabelul 10.II).

TABELUL 10.II

NUMĂR DE RECEPTORI PER CELULĂ PENTRU DIFERITE TIPURI DE IFN

Celula	IFN alfa	IFN gamma
Limfocite T	230	520
Limfocite B	440	?
Monocite	4 000	1 800
Celule Daudi (transformate)	4 200	7 900

Legarea IFN de receptori se face și la 4°C, dar endocitoza complexului IFN-receptor și inițierea sintezei mesagerilor secundari care intervin în apariția efectelor biologice are loc numai la 37°C. După legarea receptorilor, rata de sinteză a unor noi situsuri de cuplare scade, apare reglarea negativă a receptorilor, ceea ce explică și ineficiența unor doze succesive.

UTILIZAREA IFN ÎN CLINICĂ

Interferonii reprezintă primele citokine sintetizate prin tehnologia ADN recombinant și aplicate cu succes la bolnavi. Efecte reproductibile spectaculoase s-au obținut, mai ales, cu IFN alfa natural. Aceasta se explică prin sinteza unor subspecii în cazul preparatelor de IFN recombinant și a unui cocktail conținând cele peste 20 de subspecii în cazul IFN natural, produs pe limfocite sau limfoblaste. Administrarea IFN se face fie local, fie sistemic (intramuscular). În prima alternativă se citează succese în tratamentul unor afecțiuni virale oculare (herpes, adenovirusuri etc.) sau papilomatoase; în al doilea caz, administrarea s-a făcut fie mizând pe efectul antiviral (hepatita cronică cu VHB sau cu VHC) (fig. 10.1), fie pe cel antitumoral (leucemii, limfoame).

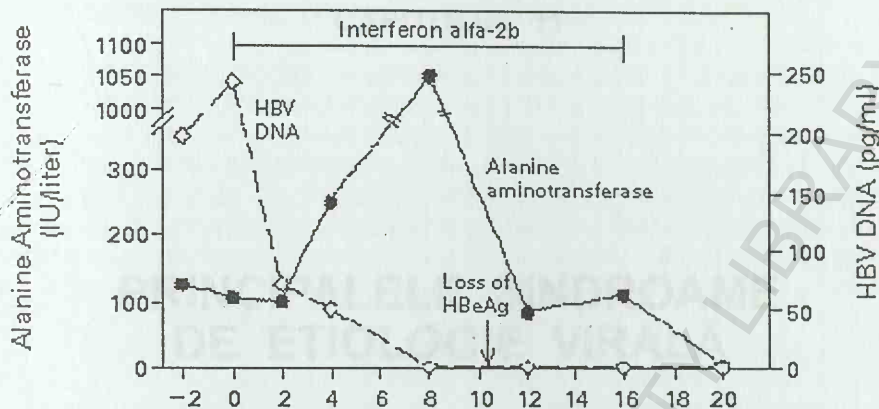


Fig. 10.1. Acțiunea antivirală a interferonului în hepatita B cronică: încărcarea virală (VHB/ADN) scade din prima săptămână de tratament, iar transaminazele numai după 12 săptămâni, nu fără a se înregistra un croșeu în săptămâna 6-8 explicat de efectul imunomodulator al IFN.

Acțiunea benefică a IFN nu este lipsită de efecte adverse sau de inconveniente. Prin supradozare se induce febră, anorexie, astenie, depresii cu tendința la suicid etc. De asemenea, trebuie reținut că IFN inhibă replicarea virală, dar nu exclude genomul viral, ceea ce poate promova infecția persistentă. În privința efectului antitumoral s-a constatat că IFN (mai ales, IFN gamma) exercită asupra celulelor nediferențiate, cu grad mai înalt de malignitate.

Sinteză

Interferonii sunt proteine codificate de celula gazdă în urma derepresării unor gene sub acțiunea inductorilor de interferon. Utilizarea terapeutică a IFN sau a inductorilor de IFN vizează atât efectul antiviral (mai pronunțat pentru tipurile alfa/beta), cât și activitatea antitumorală și imunomodulatoare (IFN gamma). Disponibilitatea unor cantități mari de IFN recombinant a lărgit spectrul aplicațiilor clinice.

BIBLIOGRAFIE

- Issacs & Lindenmann. Proc. R. Soc. London Ser. B. 1957;147:258-267.
 Baron and Rita (eds.). The Interferons. Academic Press, New York, 1967.
 Cantell P. The Story of Interferon. World Scientific Publishing Co, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1998.
 Horsmans Y. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C. J. Antimicrobial Chemotherapy 2006;58(4):711-713.

CAPITOLUL 11

PRINCIPALELE SINDROAME DE ETIOLOGIE VIRALĂ

De reținut:

Toate sindroamele descrise în acest capitol nu sunt specifice numai virusurilor. Diagnosticul etiologic diferențial trebuie să includă alte cauze infecțioase (rickettsii și chlamydii, bacterii și mycoplasme, fungi, protozoare, helminți) și cauze neinfecțioase.

CADRU GENERAL

Considerând infecțiile virale în raport cu organul sau sistemul particular implicat facem două precizări:

- niciodată infecția virală nu se limitează la un singur organ;
- spectrul etiologic al sindroamelor se schimbă în timp, în raport cu ansamblul factorilor epidemiologici: virus, organism gazdă, factori ai mediului.

VIROZE ALE TRACTULUI RESPIRATOR SUPERIOR

Infecțiile respiratorii sunt cele mai frecvente afecțiuni ale omului modern, survenind după estimări riguroase în număr de 5-6 episoade per individ și per an. Ele sunt în peste 50% din cazuri cauzate de virusuri (tabelul 11.1).

TABELUL 11.1

VIROZE ALE TRACTULUI RESPIRATOR

Forma clinică	Etiologie virală comună	Etiologie virală rară
Guturai, rinofaringite	rhino, coronavirusuri	enterovirusuri (cox)
Laringotraheobronșite	VRS, v. paragripale	adeno, v. rujeolos
Bronșite	v. gripale	v. paragripale
Pneumonii	v. gripale, SARS	v. gripei aviare, mycoplasme

Caracteristic virozelor respiratorii sunt contagiozitatea mare, transmiterea aeriană prin aerosoli sau picături, determinarea de epidemii în special în sezoanele de trecere cald-rece-cald. Frecvența formelor clinice inaparente în raport cu infecțiile simptomatice nu este foarte mare, iar imunitatea consecutivă bolii este de scurtă durată. Subliniem caracterul pasager al imunității specifice datorat limitării conflictului virus - organism la epiteliul respirator și repetarea virozelor respiratorii ca urmare a mării diversități de serotipuri antigenice. În rezistența dobândită consecutiv infecției, un rol major îl au anticorpii secretori de tip IgA de la nivelul mucoasei respiratorii și sinteza de interferon endogen. Interferonul este un stimulant al activității celulelor NK (natural ucigașe) care intervin ca efectori nespecfici celulari în sterilizarea organismului consecutiv infecțiilor acute.

Cele mai severe forme survin la vârstele extreme. De exemplu, anii epidemici de gripă sunt marcați de "exces" de letalitate la vârstnici, în special la cei cu afecțiuni cronice cardiopulmonare. Epidemiile de laringotraheită obstructivă (crup) determinate de virusul respirator sincițial (VRS) produc decese în special la copiii sub 6 luni. În acest ultim caz, prezența anticorpilor materni sau a celor induși prin vaccinare nu este benefică ci, paradoxal, agravantă. Formarea de complexe antigen - anticorp pe membrana celulelor infectate conduce la eliberarea unor produși cu activitate bronhoobstructivă.

Profilaxia acestor viroze este tributară vaccinurilor doar în câteva cazuri (gripa, rujeola), mai importante fiind măsurile de igienă generală, evitarea aglomerațiilor și a contactului cu bolnavii.

GASTROENTERITE VIRALE

Boala diareică acută (BDA) este prima cauză de morbiditate și mortalitate la copiii din țările în curs de dezvoltare. Chiar în țările dezvoltate gastroenteritele sau diareile acute reprezintă, după infecțiile respiratorii, cele mai frecvente afecțiuni. Pondere etiologiei virale a devenit evidentă mai ales în urma eșecului terapiei cu antibiotice. Îmbolnăvirile sunt autolimitante la copiii sănătoși și normoponderali. La prematuri, distrofici, malnutriți, BDA determină rapid deshidratare și, în lipsa terapiei de susținere adecvate, evoluții severe cu letalitate mare. Virusurile cele mai frecvent implicate sunt:

- rotavirusurile, care determină gastroenterite endemice, nesezoniere,
- calicivirusurile, răspunzătoare de gastroenteritele epidemice sezoniere,
- astrovirusurile, adenovirusurile etc.

Pe măsură ce diagnosticul prin imunoelectronmicroscopie a fost mai mult practicat au fost semnați și alți agenți virali răspunzători de BDA: coronavirusuri, adenovirusuri enterice sau noncultivabile, astrovirusurile.

Diagnosticul prin imunofluorescență a arătat tropismul particular al tuturor acestor agenți pentru enterocitele diferențiate situate pe vilii mucoasei intestinale. Antigenele virale nu sunt prezente în celulele care mărginesc criptele mucoasei sau lamina propria. Distrucția enterocitelor mature în urma citolizei virale determină înlocuirea lor de celule epiteliale imature, incapabile să asigure transportul glucozei facilitat de pompele de sodiu. Diareea rezultă din blocarea absorbției glucozei, secundară transportului ionic alterat. Acest mecanism este complet diferit de ceea ce se întâmplă în BDA cu bacterii enterotoxigene, unde diareea este datorată hipersecreției intestinale provocate de enterotoxine.

Rezistența la infecțiile digestive ulterioare se corelează mai bine cu prezența anticorpilor secretori de tip IgA în lumenul intestinal decât cu prezența IgG în ser. Alăptarea la sân, prin anticorpii materni, este un element important în controlul BDA în primul an de viață. Trecerea copiilor la alimentația artificială este frecvent asociată cu apariția BDA.

Este necesar să amintim pe scurt și boli nondiareice ale tractului digestiv de etiologie virală. Ocluzii la copii sub 2 ani, adenite mezenterice, apendicite pot fi asociate infecțiilor adenovirale. Ocluzii la copiii sub 2 ani au fost notate și consecutiv administrării unor vaccinuri antirotavirale.

NEUROVIROZE ACUTE

Multe meningite (aseptice, cu lichid clar) și majoritatea encefalitelor sunt de etiologie virală. Excluzând complicațiile meningoencefalitice frecvente în rujeolă, oreion, varicelă, precum și cazurile rare determinate de virusuri exotice (virusul choriomeningitei limfocitare - arenavirus transmis de la rozătoare) etiologia cea mai frecvent incriminată este rezumată în tabelul 11.II.

Meningitele virale determinate de enterovirusuri au uneori incidență epidemică. Semne clinice însoțitoare, caracteristice afecțiunii de bază (parotidita, în cazul oreionului, erupții cutanate, în cazul virusurilor Cocksackie și ECHO etc.) orientează diagnosticul etiologic.

TABELUL 11.II

NEUROVIROZE ACUTE

Sindromul clinic	Etiologie virală frecventă	Etiologie virală rară
Meningite aseptice	v. urlian, poliovirusuri	enterovirusuri, v. choriomeningitei limfocitare
Encefalite	arbovirusuri, HSV, v. rabic	v. rujeolos, entero 71
Encefalomielite postinfecțioase	v. rujeolos	postvaccinale
Sindrom postviral de oboseală cronică	v. Epstein-Barr	
Demențe	prioni	

Encefalitele determinate de arbovirusuri sunt limitate ca distribuție la nișa ecologică a insectei vectoare. Omul este o gazdă incidentală pe parcursul ciclului natural al unor infecții arbovirale care sunt, de obicei, specifice unor mamifere sălbatice sau domestice. Pe teritoriul României (zona Deltei Dunării este mai ales vizată) au fost izolate virusurile encefalitei transmise de căpușe. Encefalita herpetică este determinată de tipul 1, cu excepția herpesului neonatal cu complicații neurologice în care este incriminat tipul 2 (herpes genital). Leziuni herpetice genitale la gravidele la termen impun operația cezariană.

Encefalomielitele postinfecțioase sau postvaccinale sunt complicații demielinizante de temut cu mortalitate mare sau leziuni sechelare ireductibile. Mai multe alternative patogenice pot fi discutate, între care reacțiile autoimune au mulți aderenți.

Recent, două entități apărute la distanță de infecții virale acute au atras atenția neurologilor: sindromul postviral de oboseală cronică și sindromul postpoliomielitic. Este vorba de astenie, fasciculații musculare, durere musculară.

În fine, foarte rare afecțiuni cronic degenerative ale SNC sunt atribuite astăzi prionilor. Este vorba de encefalopatiile subacute spongiforme (exemplu, boala Creutzfeldt Jakob) clinic manifeste ca demențe presenile.

VIROZE CUTANATE

Excluzând tumorile benigne localizate (veruci sau negi), determinate de papillomavirusuri și *molluscum contagiosum*, determinată de un poxvirus, există numeroase erupții cu caracteristici dermatologice bine conturate care survin în cursul unor viroze cu evoluție sistemică (tabelul 11.III). Totuși, un diagnostic etiologic bazat numai pe aspectul erupției este hazardat, chiar dacă el aparține unui dermatolog versat. Numeroase alte cauze iritative ale pielii (de la agenți poluanți, la cosmetice și săpunuri) complică în prezent aspectul leziunilor. Diagnosticul poate fi orientat de semne asociate sau de tehnicile virusologice între care imunofluorescența crustelor sau a foliculului pilos aduc informații prețioase.

TABELUL 11.III

VIROZE CUTANATE

Sindromul clinic	Etiologie virală frecventă	Etiologie virală rară
Rash maculopapular	Rujeola, rubeola	Enterovirusuri
Rash vezicular	Herpes, varicela	Enterovirusuri
Rash hemoragic	Arbovirusuri, filoviridae	Febre hemoragice
Rash cu pustule	Variola	Monkeypox

ALTE SINDROAME VIRALE

Continuând lista localizărilor mai frecvente ale infecțiilor virale, câteva precizări vor viza infecțiile urinare, miocardopatiile, artritele și conjunctivitele.

Virusurile sunt excretate în multe infecții generalizate (herpes, adeno, toga, polyoma etc.). Totuși, afectarea renală nu a fost remarcată decât în infecția citomegalică, cu virusul hepatitei B și, mai ales, cu virusurile Hantaan (ale febrei hemoragice cu sindrom renal - HFRS). Ultimele sunt virusuri ARN, sferice, neanvelopate, cu o capsidă dublă, care determină periodic epidemii de "nefropatie endemică balcanică" în arealul limitrof Dunării la granița româno-bulgaro-sârbă. HFRS este o nefropatie acută virală cu febră mare, dureri acute abdominale și în lojile renale, hematurie și insuficiență renală. Epidemii au fost remarcate încă din anii '50, ultima cu peste 200 de cazuri în Iugoslavia, în 1989.

Miocardopatii acute în special la nou-născuți au fost asociate etiologic cu infecțiile Coxsackie B 1-5. Evoluția este de multe ori fatală, iar vindecările sunt urmate de suferințe cardiace cronice.

Artritele sunt manifestări comune în infecții virale în care formarea complexelor imune constituie un element major în patogenie: hepatita B, rubeola, febra denga (numită popular "*break bone fever*").

Conjunctivitele sunt adesea determinate de virusuri. Conjunctivite epidemice au fost urmarea unor infecții, cu adeno 8, entero 70, gripă aviară H5N7 sau cu paramixovirusul New Castle). Mai severe sunt leziunile corneene provocate de infecțiile herpetice sau de rubeola congenitală. În primul caz, leziunea este de tipul ulcerului dendritic, în cel de-al doilea cataractă sau glaucom.

VIROZE CU TRANSMITERE SEXUALĂ

Ultimele trei secțiuni se referă la afecțiuni grupate după calea de transmitere și nu după organul țintă. În fapt, importanța lor ca probleme de sănătate publică argumentează o astfel de abordare. Multe viroze sunt transmise sexual (tabelul 11.IV) impunând elementele de profilaxie specifice bolilor venerice. Profilaxia gravidei infectate are implicații particulare asupra sănătății fătului (tabelul 11.V).

Alți germeni cu transmitere sexuală comportă aceleași măsuri de profilaxie și control: *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Phthirus pubis*, *Sarcoptes scabiei* etc.

Papillomavirusurile (HPV) determină tumori benigne ale mucoasei vulvovaginale sau ale cervixului, iar genotipurile HPV 16, 18, 31 pot fi la originea unor carcinoame de col uterin.

Herpesvirusurile determină vulvovaginite, cervicite, iar virusul citomegalic este implicat în patologia renouetrală. Virusul HIV (dar și celelalte retrovirusuri umane) se transmite sexual, transmisie favorizată de existența leziunilor inflamatorii genitale cauzate de herpesvirusuri, de rickettsii, chlamydii sau mycoplasme.

Virusurile hepatitei B și C (mai puțin) se transmit și pe cale sexuală. VHB este un caz particular prin constanța infectivității sporite la purtătorii cronici de AgHBs.

TABELUL 11.IV

AGENȚI VIRALI CU TRANSMITERE SEXUALĂ ȘI BOLILE CORESPUNZĂTOARE

<i>Virusul</i>	<i>Prezentare clinică</i>	<i>Sechele posibile</i>
V. hepatitei B și C	Hepatite	Hepatită cronică, ciroză, carcinom hepatic
V. herpes simplex 2	Ulcerații genitale	Infecții fetale
HIV 1 și 2	Imunodeficiență	SIDA
Papillomavirusuri	Veruci genitale, condyloma acuminata	Cancere col uterin, anogenitale

TABELUL 11.V

INCIDENȚA INFECTĂRII FĂTULUI ÎN UNELE VIROZE ALE GRAVIDEI

<i>Virusul</i>	<i>Infecții materne la 1 000 sarcini</i>	<i>Contaminări</i>	
		<i>intrauterine</i>	<i>neonatale</i>
V. herpes simplex (VHS 2)	10-110	rare	0,1-0,5
V. rubeolei	1-10	5-25	rare
V. citomegalic (CMV)	40-150	5-25	10-70
V. hepatitei B (VHB)	1-10	rare	0,1-0,3
HIV	<1	rare	1-10

TABELUL 11.VI

CONSECINȚELE INFECȚIEI FETALE PE CALE TRANSPLACENTARĂ

<i>Semne clinice</i>	<i>Rubeola</i>	<i>CMV</i>	<i>VHB</i>	<i>HIV</i>	<i>T. pallidum</i>
Prematuritate		+		+	+
Întârziere creștere fetală	++	++		+	++
Malformații	++	++			
Maladii congenitale	++	++			++
<i>Alte virusuri transmise materno-fetal sunt: herpesvirusul uman 8, parvovirusul B19. CMV și HH8 sunt tratate la herpesvirusuri</i>					

VIROZE PERINATALE

Transmiterea verticală de la mamă la făt (tabelul 11.VI) poate determina fie virusuri diseminate severe ale fătului, fie efecte teratogene - malformații congenitale mergând de la moartea fătului și avort spontan până la leziuni ireductibile grave (surditate, retinopatie etc.). O problemă fundamentală este definirea perioadei (intrauterine, intra-partum sau post-partum), când riscul transmiterii verticale este maxim.

Modelul virusului rubeolos (și citomegalic) argumentează transmiterea transplacentară: virusul este izolat de la fătul de 14-20 de săptămâni; liniile celulare inițiate din celulele trofoblastice sunt susceptibile la replicarea virală. Infecția rubeoloasă congenitală este însoțită de persistența sintezei anticorpilor IgM la făt.

Rubeola este o boală eruptivă a copilăriei cu evoluție blândă. Rubeola nu a constituit mult timp decât o problemă de diagnostic diferențial cu rujeola sau scarlatina. În 1941, oftalmologul australian Gregg a notat creșterea incidenței cataractei congenitale în anul care succedă unei epidemii de rubeolă, asociere confirmată ulterior și extinsă la alte anomalii ale fătului datorate infecției rubeoloase intrauterine. Epidemiile de rubeolă apar la un interval de 5-7 ani și constituie un risc enorm pentru gravidele care nu au fost imunizate natural sau artificial. Infecția mamei în primul trimestru de sarcină este urmată în 80-90% din cazuri de infecția transplacentară a fătului, cu apariția malformațiilor congenitale. După săptămâna 22 de sarcină (în trimestrul III), defectele fătului sunt rare; mai ales, surditate congenitală. Este înțelept ca orice infecție confirmată a mamei cu virus rubeolos în primul trimestru al sarcinii să constituie o indicație de avort terapeutic.

Virusul rubeolos nu se transmite prin vectori, ci aerogen, interuman. Boala are o incubatie medie de 18 zile și se caracterizează prin rash maculopapular punctiform și limfadenopatie (retroauriculară). Virusul trece placenta la gravide și determină o infecție persistentă a fătului care are un sistem imun imatur. La făt virusul afectează organogeneza, determinând variate malformații congenitale (este unul din agenții teratogeni reușiți sub sigla **TORCH**: toxoplasma, rubeola, citomegalovirus și herpes genital). Fătul rămâne infectat și continuă să excrete virus și după naștere (pericol pentru personalul din maternități). Un vaccin viu atenuat este întrebuintat pentru profilaxia sindromului rubeolei congenitale.

În România, în jur de 15% dintre femeile care nasc (grupele de vârstă 19-29 ani) sunt susceptibile la rubeolă. Aceasta înseamnă că în aproximativ 20 000 de nașteri anual există riscul sindromului rubeolos congenital (Cernescu și colab., 2002). Prevenirea acestuia se face prin vaccinarea antirubeoloasă la copii sau la adolescente.

Scopul imunizării împotriva rubeolei este prevenirea sindromului rubeolos congenital (SRC). De la inițierea programelor naționale de

vaccinare în anii '70 și până în prezent au fost utilizate două strategii pentru atingerea acestui scop. Strategia indirectă preconizează imunizarea tuturor copiilor după vârsta de 12 luni și asigurarea unei acoperiri vaccinale de peste 95% care să întrerupă transmiterea virusului rubeolos. În cazul în care acoperirea vaccinală nu trece de 70%, această strategie poate determina creșterea incidenței rubeolei la adolescenți și tineri și, implicit, un număr mai mare de cazuri de SRC. Cea de-a doua opțiune în imunizarea antirubeoloasă este vaccinarea fetelor la adolescență. Această strategie "directă" asigură protecția femeilor care nasc și, cu cheltuieli mai mici, contribuie la limitarea urmărilor SRC.

Diagnosticul de laborator se bazează pe evidențierea seroconversiei anticorpilor hemaglutinoinhibanți antirubeoși sau imunoenzimatic. Titrurile mici de anticorpi sunt greu de interpretat (datorită inhibitorilor nespecifiți). De aceea, se indică evaluarea seroconversiei pe o a doua probă de ser recoltată după două, trei săptămâni sau evidențierea anticorpilor de tip IgM (prin ELISA de captură). O problemă dificilă este așa numita reinfecție rubeoloasă la mamele care vin în contact cu surse noi de infecție. În principiu, reinfecția rubeoloasă nu comportă risc teratogen, însă evidențierea anticorpilor de tip IgM constituie un argument pentru replicarea activă a virusului. La fel de controversată este administrarea vaccinului viu antirubeolos la femei la vârsta fertilității. Practic, este bine să contraindicăm vaccinarea dacă nu avem posibilitatea de a exclude diagnosticul de sarcină în evoluție. La nou-născut rubeola congenitală se diagnostichează tot prin evidențierea anticorpilor de tip IgM. Mai mult, persistența lor dincolo de vârsta de 6 luni justifică evaluarea atentă a malformațiilor congenitale posibile. Lista acestora din urmă este foarte variată, cuprinzând defecte oculare, auditive, cardiovasculare, ale SNC etc. În prezent, profilaxia rubeolei și, implicit, a rubeolei congenitale se face prin administrarea unui vaccin viu atenuat inclus de regulă în vaccinul trivalent MMR (*measles, mumps, rubella* - rujeolă, oreion, rubeolă). Trebuie notat că în lipsa unui efort de imunizare susținut, a peste 90-95% din copii, întreruperea transmiterii rubeolei nu se realizează, existând pericolul creșterii incidenței bolii la vârsta adultă și la gravide. O altă strategie pentru profilaxia rubeolei propune vaccinarea obligatorie a fetelor până la 12 ani. Rubeola congenitală este o afecțiune virală care teoretic poate fi eradicată, lipsind numai suportul financiar și efortul organizatoric.

Modelul hepatitei B este caracteristic pentru transmiterea intra-partum. Expunerea fătului la sângele infecțios al mamei în cursul nașterii explică infecția timpurie și evoluția severă către hepatita cronică și, tardiv, către carcinom hepatic. Limitarea perioadei de risc la intervalul nașterii facilitează intervenții benefice: administrarea la făt

de imunoglobuline specifice sau vaccinarea timpurie antihepatită B. HIV, virusurile herpetice, enterovirusurile se transmit în același mod.

Transmiterea postnatală pune probleme delicate vizând despărțirea copilului de mama potențial infectantă. Alăptarea naturală poate constitui un factor de risc (hepatite virale, HIV, HTLV), dar argumente clare care să contrabalanseze avantajele aduse de hrănirea naturală la sân lipsesc. Desigur că orice viroză acută a mamei poate fi transmisă postnatal copilului deși, în primele 6-9 luni, acesta este protejat de anticorpii materni transmiși transplacentar sau prin alăptare.

INFECȚII VIRALE TRANSMISE PRIN SÂNGE

Transfuzia reprezintă un vehicul ideal pentru transmiterea unor agenți infecțioși - paraziți, bacterii, virusuri - prezenți în sânge. De asemenea, o serie de derivați de sânge care provin din prelucrarea unor pooluri furnizate de mai mulți donatori implică riscul unor complicații infecțioase. În prezent, includerea unor etape de inactivare a posibilibor contaminanți infecțioși este un procedeu comun în producția acestor derivate. De exemplu, tratamentul termic, iradierea sau utilizarea unor antiseptice care nu afectează valoarea biologică a derivatelor de sânge, dar inactivează o serie de virusuri sunt utilizate în prepararea factorilor antihemofilici VIII și IX, factori responsabili în trecut de frecvente complicații infecțioase.

Două afecțiuni virale constituie obiectul preocupărilor curente de securizare a sângelui: hepatitele virale și SIDA. Alte virusuri care determină infecții persistente vor îngreuna probabil în viitor etapele de triaj al sângelui în ideea excluderii unor complicații infecțioase: virusul citomegalic, virusul EB, HTLV, prioni.

Triajul donatorilor de sânge pentru prezența AgHBs cu metode moderne, de ultimă generație, a redus riscul hepatitei B posttransfuzionale fără a-l elimina complet. Se apreciază că pragul de sensibilitate al RIA sau ELISA pentru AgHBs se oprește la aproximativ 100 de doze minim infectante pentru virusul hepatitei B și, consecutiv, riscul hepatitelor posttransfuzionale nu poate fi exclus. O serie de markeri "surogat", nespecfici pentru excluderea acestui risc au fost propuși: determinarea transaminazelor serice (alanin-aminotransferaza) sau anticorpilor anti-HBc. În 1989 "cutia neagră" a hepatitelor nonA nonB nonC a fost în parte clarificată, definindu-se două noi tipuri de hepatite virale (HV): TT - cu transmitere parenterală - și HVE - cu transmitere predominant digestivă.

Infecția HIV este un alt motiv serios de îngrijorare în contextul transfuziei. În ciuda sensibilității metodelor actuale de triaj, existența unei perioade relativ lungi de "fereastră negativă a seroconversiei"

menține riscul transmiterii HIV prin sânge. De aceea, screeningul prin laborator trebuie dublat de efortul de a exclude donatorii cu factori de risc recunoscut: homosexuali, transfuzați, hemofilici etc. (tabelul 11.VII).

TABEL 11.VII

FEREAȘTRA SEROLOGICĂ (ZILE) ÎN CAZUL BOLILOR VIRALE TRANSMISE PRIN TRANSFUZII

<i>Virusul</i>	<i>Fereaștra serologică cu teste imunoenzimice (zile)</i>		<i>Fereaștra serologică prin teste care decelează antigenomia (zile)</i>
	Medie	Intervale	
VHB	59	37 - 87	25
VHC	82	54-192	59
HIV	22	6-38	6
HTLV I	51	36-72	-

Această excludere este greu de realizat în lipsa unei cooperări cu donatorii a căror educație trebuie să determine autoexcluderea în cazul unui comportament cu risc (tabelul 11.VIII).

TABEL 11.VIII

RISCUL ESTIMAT PENTRU TRANSMITEREA TRANSFUZIONALĂ A PRINCIPALELOR BOLI VIRALE

<i>Virusul</i>	<i>Risc per transfuzie</i>	<i>Seroconversia*</i>	<i>Intervale de confidență**</i>
VHB	1/63 000	9,80	6,74-13,42
VHC	1/103 000	4,32	2,35-6,87
HIV	1/493 000	2,37	2,22-4,76
HTLV	1/641 000	1,12	0,51-1,98
Risc agregat	1/34 000	18,61	

*Rata seroconversiei per 100 000 persoane transfuzate, per an.

**95% interval de confidență.

Descoperirea virusului hepatitei C (VHC) este un model pentru o nouă strategie în izolarea agenților virali: clonare fără o prealabilă caracterizare a agentului infecțios. Cu alte cuvinte, în lipsa oricărei informații asupra structurii noului virus se procedează la extracția de acizi nucleici din plasma animalelor (cimpanzeu, în acest caz), cu titru infectant masiv, apoi la amplificarea acizilor nucleici extrași, integrarea ADNds în genomul unui fag și expresia acestuia într-un sistem bacterian apropiat. Proteinele exprimate sunt în final testate pentru recunoașterea lor de anticorpii prezenți la bolnavi iar cele frecvent și intens reactive sunt selecționate ca antigene specifice ale noului virus.

Sinteză

Rezultatul infecției virale este afectat de mulți factori: calea de transmisie, doza infectantă, statusul imun al gazdei, leziunile virale și imun induse etc. Același virus poate determina sindroame diferite localizate și același sindrom poate fi cauzat de virusuri neînrudite. Alternativa etiologiei virale trebuie avută în vedere nu numai în bolile acute. Patologia cronică care face obiectul tuturor specialităților medicale implică uneori frecvent, alteori excepțional, componente etiologice virale. O serie de medicamente de uz curent pot afecta replicarea virală (corticosteroizi, imunomodulatori, citostatice etc.). Decizia terapeutică trebuie să țină seama de relația virus - gazdă nu ca ultim refugiu în situații disperate, ci în urma unui diagnostic viral solicitat logic și efectuat cu profesionalism.

Site-uri pe Internet

www.clinicalcare.org

www.pubmed.gov

www.stdhivpreventiontraining.org

VACCINURI VIRALE

De reținut:

Vaccinurile virale conțin fie virusuri vii atenuate, fie virusuri sălbatice a căror infectivitate a fost inactivată fără a altera imunogenitatea. În afara vaccinurilor vii, respectiv, inactivate, următoarele preparate alternative pot fi întrebuințate în imunizările antivirale: vaccinuri subunitare, vaccinuri obținute prin tehnologia ADN recombinant, peptide sintetice, vaccinuri hibride, anticorpii antiidiotip.

Vaccinarea este cea mai importantă metodă de combatere a bolilor infecțioase. Ea determină în mod activ modificarea susceptibilității macroorganismului prin edificarea unui răspuns imun specific. Rezistența specifică poate fi influențată și pasiv, prin administrarea serurilor specifice antivirale sau a imunoglobulinelor.

Vaccinurile virale pot conține corpusculi infectanți - vaccinuri vii - sau virusuri inactivate, eventual fracțiuni virale - vaccinuri inactivate. Problema esențială în cazul vaccinurilor vii este securitatea preparatului atât în ceea ce privește inocuitatea sau reactogenitatea virusului din vaccin, cât și absența altor agenți infecțioși criptici. În ceea ce privește vaccinurile inactivate tehnologia aleasă trebuie să asigure păstrarea nealterată a imunogenității în timp ce infectivitatea este compromisă.

VACCINURI VIRALE VII (V.V.)

Vaccinurile virale vii sunt întrebuințate în una din următoarele alternative:

(a) utilizând virusuri antigenic înrudite cu agentul etiologic al virozei de combătut, dar nevirulente pentru om. Exemplu: virusul vaccinal în profilaxia variolei;

(b) folosind tulpini natural atenuate; exemplu: tulpinile Sabin în poliomielită sau Max Theiler (17D) în febra galbenă;

(c) atenuând în laborator tulpinile virulente prin selecție sub acțiunea unor presori fizici (temperatura suboptimală), chimici (condiționări

de mediu), biologici (pasaje pe substrat celular depărtat filogenetic de gazda umană);

(d) utilizând virusul neatenuat în doze mici sau asociat cu administrarea simultană de anticorpi specifici;

(e) utilizând virusul neatenuat administrat pe căi de inoculare diferite de calea naturală, exemplu: vaccinuri antiadenovirale administrate per os în capsule enterice.

TABELUL 12.1

PROPRIETĂȚI COMPARATIVE ALE VACCINURILOR

<i>Vaccinuri vii</i>	<i>Vaccinuri inactivate, subunitare</i>
Se replică și se transmite activ	Nu se replică, nu se transmite
<i>Avantaje principale</i>	
Răspuns imun celular și umoral; Necesită rapeluri puține; Induc imunitate de durată	Nu dau revertanți patogeni; Necesită doze puține; Standardizare posibilă

Limitele vaccinurilor vii sunt: simptome severe la imunosupresia (i), potențial pentru apariția de revertanți sălbatici, virulenți (ii), stabilitate la stocaj relativ precară (iii). Vaccinurile vii se pot administra singure sau combinate (mai multe vaccinuri inoculate simultan).

VACCINURI VIRALE INACTIVATE (V.I.)

Vaccinurile virale inactivate sunt obținute prin tratamentul fizico-chimic al stocurilor de virus preparat cu tulpini sălbatici, neatenuate. Procesul de inactivare este condus în așa fel încât infectivitatea să fie alterată iar imunogenitatea conservată. Agenții chimici utilizați sunt formolul sau beta-propiolactona.

Căldura sau iradierea cu ultraviolete sunt agenți fizici frecvent folosiți. În ideea creșterii purității și scăderii toxicității s-au preparat vaccinuri conținând numai fracțiunile virale imunogene (exemplu: hemaglutinina virusului gripal) implicate în inducția răspunsului imun protector. Alte viroze care beneficiază de vaccinuri inactivate sunt: poliomiелita, rabia, hepatita A și B etc.

Administrarea vaccinurilor este un act medical care vizează un număr extrem de mare de subiecți, generații întregi de copii. De aceea, reacțiile adverse sau riscurile asociate vaccinării trebuie corect evaluate pentru că cifre minime de accidente pot reprezenta un număr semnificativ de complicații la nivel populațional. Reactogenitatea V.V. ține de gradul de atenuare al tulpinii vaccinante, iar pentru V.I. de impurificarea antigenului protector cu substanțe din substratul de cultivare a virusului. Alte elemente de risc sunt determinate de apariția

eventualilor revertanți reactogeni ai tulpinilor atenuate sau de prezența altor agenți biologic activi (virusuri sincițiale criptice, virusuri oncogene etc.) în special în V.V.

V.V. sunt imunogene și consecutiv administrării pe căi naturale (exemplu, vaccinul polio oral cu tulpinile Sabin, lipsite de neurotropism), ceea ce este avantajos atât din punctul de vedere al prețului de cost, cât și pentru primitori, care acceptă imunizarea fără teamă. Profesorul Cajal a sugerat același mod de administrare, pe căi naturale, pentru vaccinul rujeolos. O atentă evaluare a gradului de atenuare a tulpinilor vaccinante permite administrarea acestora pe cale intranasală sau intraconjunctivală, cu bune rezultate în privința imunogenității.

V.I. induc un răspuns imun semnificativ (ca titru individual de anticorpi, proporție de primitori cu seroconversie și persistență a anticorpilor) numai după scheme complete de imunizare, care presupun administrarea de doze multiple și rapeluri corect distanțate. V.V. sunt imunogene și consecutiv unei administrări unice. De asemenea, V.V. au avantajul extrem de important al inducției unui răspuns imun global, celular și umoral, pentru că administrarea lor realizează fie forme fruste, fie mitigate de boală asemănătoare bolii naturale. Imunitatea consecutivă V.I. este limitată numai la unele antigene etalate la exteriorul virionului și acestea modificate de procedeele de inactivare. În cazul în care V.V. au capacitatea de a difuza de la vaccinați la contactii acestora, este evidentă posibilitatea imunizării ultimilor și a înlocuirii tulpinilor sălbatice care evoluează în același areal. Cu alte cuvinte, atât pentru individ, cât și pentru comunitate V.V. prezintă avantaje notabile (tabelul 12.I). Există însă și dezavantaje ale V.V., mai ales în comparație cu V.I., care au argumentat folosirea în continuare a celor două soluții, adesea în scheme mixte, complexe (vacinarea antipoliomielitică). Aceste dezavantaje sunt:

- instabilitatea la stocaj sau transport în absența lanțului de frig;
- difuziune necontrolată la contacti și apariția revertanților în urma pasajelor interumane;
- interferarea lor de alte virusuri cu care împart același habitat în organism (polio-/enterovirusuri);
- reacții severe, greu previzibile în cazul administrării la subiecții imunodepreșați;
- riscul teoretic al vehiculării unor agenți criptici din substrat cu potențial oncogen.

ALTERNATIVE MODERNE DE OBTINERE A VACCINURILOR

În ultima decadă, utilizarea anticorpilor monoclonali pentru identificarea antigenelor protectoare și a tehnologiei ADN recombinant pen-

tru producerea unor cantități mari de imunogeni au evidențiat noi tehnologii de producere a vaccinurilor. Acestea sunt:

1. producția de proteine virale recombinante;
2. folosirea peptidelor sintetice ca imunogeni;
3. construirea de virusuri atenuate prin mutații dirijate;
4. construirea de hibrizi virali purtând imunogeni multipli;
5. utilizarea anticorpilor antiidiotip ca vaccinuri.

1. **Proteinele virale recombinante** au fost sintetizate fie în celule prokariote transformante cu vectori plasmidieni sau cu fagi, fie în celule eukariote care prezintă avantajul secreției în mediu a proteinelor glicozilate. Ca urmare, primul sistem a fost folosit pentru proteine care au epitopi lineari (picornavirusuri, virusul herpes simplex) recunoscuți de limfocitele B, iar al doilea pentru majoritatea proteinelor virale care expun epitopi conformaționali. În ciuda unor probleme tehnologice legate de calitatea fermentoarelor care permit creșterea celulelor eukariote, acest sistem este azi cel mai eficient. Identificarea unor promotori ai expresiei genelor, ca și tehnicile noi de selecție și amplificare au permis conturarea următoarelor modele eukariote de producție:

- *Sacharomices cerevisiae* pentru hepatita B (AgHBs),
- celule de insecte pentru HIV (gp160),
- celule de mamifer pentru diverse alte antigene virale.

2. **Peptidele sintetice** au fost utilizate pentru prima oară ca imunogeni antivirali de Sela și colab. în 1976. În ultimii ani au fost identificate situsurile principale de neutralizare localizate la nivelul proteinelor protectoare pentru multe virusuri patogene umane. Succesul inițial obținut cu peptide sintetice în imunizarea anti-febră aftoasă la animale nu a fost însă reprodus cu secvențe peptidice mimând epitopi ai unor virusuri umane. De aceea, acest model a fost reformulat în două direcții:

- utilizarea peptidelor sintetice ca "primer" pentru inocularea consecutivă cu virus în doze subimunogene sau cu proteine recombinante;

- transformarea secvențelor lineare ale peptidelor în epitopi conformaționali care le sporesc imunogenitatea prin încorporarea lor în particule autoasamblate. Astfel de particule sunt reprezentate fie de lipozomi (AgHBs sau AgHBC), fie de complexe imunostimulante (ISCOM) obținute prin cuplare chimică a mai multor epitopi lineari.

3. **Construirea de tulpini atenuate** prin inginerie genetică constituie alternativa modernă a selecției sub acțiunea unui presor utilizată de vaccinurile clasice. Enumerăm câteva direcții ale acestei metodologii:

- inducția de mutante eronate (*missense mutations*),
- incompatibilitatea genetică,
- mutante defective prin inserții sau deleții,
- construirea de himere intertipice (hibrizi virali).

Mutantele eronate vizează în special proteinele anvelopei sau capsidei virale și conduc, spre exemplu, la lipsa situsurilor de clivaj accesibile proteinelor gazdă, fapt care compromite asamblarea unor particule infectante. Alteori, aceste mutante modifică secvența recunoscută de receptorii celulari alterând tropismul tisular.

- Incompatibilitatea genică este frecvent observată la virusuri cu genom segmentat (virusuri gripale, spre exemplu). Reasortanți între tulpini izolate de la specii diferite pot să se multiplice bine numai la una dintre specii, fiind atenuată la cealaltă.

- Mutantele defective obținute prin chirurgie genică se limitează numai la virusurile ADN și la cele cu genom ARN cu polaritate pozitivă (cu genom infecțios). În general, mutantele în regiunile codificând proteinele timpurii sunt viabile. Există însă pericolul așa numitelor mutante supresoare care pot compensa defectul introdus de delețiile anterioare. Himerele intertipice constituie un vis al tuturor generațiilor de virusologi care au urmărit obținerea de tulpini cu antigenitate multiplă. În poliomielită, astfel de mutante himeră au fost obținute, dar includerea lor în vaccinuri întârzie din cauza unor temeri legate de apariția eventuală și a altor însușiri nedorite la aceste mutante (oncogeneză, neurotropism etc.).

4. **Hibrizii virali** au fost obținuți prin utilizarea virusului vaccinal ca vector pentru inserția genelor care codifică proteine imunogene importante pentru protecția împotriva altor virusuri. Virusul vaccinal recombinant a putut codifica simultan antigene ale VHB, ale virusului gripal, rabic, herpetic și respirator sincițial. Acest recombinant polivalent a fost utilizat cu succes la animal, chiar dacă primitorul avea anticorpi împotriva unuia din antigenele inserate. Același vector este studiat și în vaccinarea anti-SIDA. Important de reținut este faptul că virusul vaccinal hibrid este, din fericire, mai atenuat decât parentalul atât la rozătoare, cât și la primate. Adenovirusurile reprezintă un vector potențial pentru imunizări în alte viroze digestive pentru că genomul lor conține regiuni neesențiale pentru infectivitate cu situsuri de inserție.

5. **Anticorpii antiidiotip** conțin în regiunea lor variabilă imaginea în oglindă a antigenului viral în raport cu care replica lor a fost identificată. Utilizarea lor ca imunogeni în hepatita B a condus la obținerea unui răspuns specific.

Recent, studii de mutagenезă inserțională cu virusuri atenuate au reușit expresia simultană a unor gene nonvirale, dar codificând proteine importante în edificarea răspunsului imun. Spre exemplu, expresia simultană cu replicarea virală a genei pentru interleukina 2 (IL-2) a determinat un răspuns bun chiar la gazdele imunocompromise.

VACCINAREA ÎN PRACTICĂ

În prezent, medicina umană folosește vaccinuri vii în profilaxia poliomielitei, febrei galbene, rujeolei, rubeolei, oreionului, varicelei. Încercări au mai fost făcute în adenoviroze, virusuri gripale și para-gripale. Desigur, nu trebuie omis primul vaccin viu cronologic utilizat - virusul vaccinal pentru profilaxia variolei. Eradicarea variolei ca urmare a aplicării extensive a vaccinării a scos din uz acest vaccin. Totuși, stabilitatea atenuării virusului vaccinal și mărirea genomului său au permis construirea unor recombinanți viabili care exprimă proteine antigenice pentru alte virusuri. Asistăm la o revigorare a interesului pentru virusul vaccinal ca suport pentru vaccinurile virale hibride.

V.I. au fost produse pentru majoritatea virozelor importante din punctul de vedere al sănătății publice. Curent sunt utilizate V.I. în poliomielită, gripă, rabie, encefalite virale.

Problema esențială în practica vaccinării este asigurarea protecției copilului mic în intervalul 6-24 de luni când acesta pierde anticorpii materni transferați pasiv. De aceea, formularea unei scheme corecte de imunizări este o problemă de mare responsabilitate. Redăm calendarul vaccinărilor practicate în România (tabelul 12.II).

Programul mondial de vaccinare (EPI) implementat sub egida OMS încă din 1988 a obținut până în prezent rezultate notabile în prevenirea unor viroze: eradicarea poliomielitei indigene în cele două Americi, eradicarea rujeolei în câteva țări etc. Totuși, o anumită întârziere în realizarea nivelelor propuse de acoperire vaccinală fac ca eradicarea acestor boli să nu fie previzibilă la termenele inițial propuse. Aceasta implică alocarea în continuare de fonduri însemnate acțiunilor de imunizare chiar în țările avansate, pentru că pericolul importului de cazuri cu potențial epidemic este real.

TABELUL 12.II

CALENDARUL VACCINĂRILOR PROPUȘ ÎN ROMÂNIA ÎN 2001

Vârsta (luni)	Imunizări obligatorii	Imunizări asociate
1-2 zile	hepatita B	
4-6 zile	BCG (antituberculoză)	
3 luni	DTP (diftero-tetanic pertusis)	tetra 1. (hepatita B)
4 luni	DTP a doua doză	tetra 2 (hepatita B)
5 luni	DTP a 3-a doză	
2-8 luni	TOPV 1	
4-10 luni	TOPV 2	
9 luni	rujeola	
11 luni	DTP (rapel 1)	(MMR)
12-18 luni	TOPV 3	(hepatita B)

Legendă: tetra (vaccin tetravalent inactivat: polio 1, 2, 3 plus pertussis). TOPV (vaccin trivalent oral polio 1, 2, 3). MMR (vaccin viu trivalent: rujeolă, oreion, rubeolă).

Redăm în continuare recomandările formulate de OMS pentru susținerea acțiunilor din cadrul EPI:

- introducerea altor vaccinuri care pot contribui la controlul unor boli cu mare răspândire reprezintă o prioritate, în primul rând pentru hepatita C și SIDA;

- poliomiелita va fi următoarea boală eradicată, ceea ce va elibera fonduri însemnate utilizabile în alte acțiuni de sănătate publică. Totuși, până la dispariția ultimelor cazuri, în toate țările acțiunile de imunizare trebuie continuate;

- campaniile de vaccinare constituie un bun prilej pentru oferirea altor servicii de sănătate primară copiilor cu alimentație deficicientă: administrarea de vitamina A, iod, fier, rehidratare orală, educație sanitară;

- aprovizionarea cu vaccinuri trebuie riguros planificată, iar calitatea produselor trebuie să corespundă celor mai moderne recomandări;

- administrarea vaccinurilor trebuie însoțită de implementarea unor rețele naționale de laboratoare pentru controlul serologic al eficienței imunizărilor și diagnosticul îmbolnăvirilor restante;

- derularea campaniilor de vaccinare trebuie însoțită de asigurarea mijloacelor materiale (mijloace de transport, incinte frigorifice, seringi, vaccinuri) și umane pentru folosirea rațională și economică a fondurilor alocate;

- revaccinările (în afara calendarului imunizărilor primare) constituie un element corectiv util pentru ameliorarea acoperirii vaccinale. Costul acestor acțiuni rămâne însă un element restrictiv în multe țări.

În afara acestor recomandări care rezumă elemente general aplicabile, câteva detalii trebuie precizate în legătura cu cele trei vaccinuri virale a căror aplicare extinsă va permite eradicarea unor viroze majore în viitorul apropiat.

Vaccinul polio va asigura eradicarea bolii, cu condiția concentrării eforturilor spre țările care încă au dificultăți în controlul bolii și cu condiția utilizării exclusive a V.I.

Se definesc țări indemne de poliomiелită sălbatică (*wild polio free status*), cele care nu au raportat îmbolnăviri trei ani consecutivi, ceea ce este și cazul României. Supravegherea epidemiologică trebuie să vizeze aici copiii peste 15 ani; în țările cu polio endemică vor fi raportate în special paralizile flasce la copiii sub 5 ani. În ultimele țări, vaccinarea obișnuită va fi suplimentată cu campanii naționale bianuale pentru cuprinderea tuturor celor ce s-au sustras de la vaccinare. Raportarea cazurilor paralitice va fi dublată de diagnosticul izolatelor virale pentru a avea o imagine obiectivă asupra circulației virusurilor sălbatice. Condiția esențială pentru atingerea statusului *polio-free* este administrarea a cel puțin 4 doze de vaccin polio trivalent tuturor copiilor în primul an de viață.

Vaccinul rujeolos este sigur imunogen pentru toată durata vieții și cu un raport cost/eficiență cu totul remarcabil. Vaccinul cu calitate corespunzătoare standardelor (cel pentru 1 000 DIC₅₀/doză) și, administrat copiilor peste 9 luni, este imunogen la peste 98% primitori. Vaccinarea timpurie se impune în situații speciale (copiii din focar, copiii spitalizați, copiii în lagăre de refugiați), dar nu înainte de 6 luni. O inițiativă cu urmări nedorite a fost aceea a imunizării timpurii cu vaccin supradozat. Revaccinarea antirujeoloasă, ca și administrarea vitaminei A copiilor cu rujeolă cu virus sălbatic în primul an de viață sunt acțiuni care trebuie aplicate de la caz la caz. Utilizarea imunoglobulinoprofilaxiei în focarele de rujeolă, în special la sugari, trebuie abandonată, având în vedere riscul tardiv al PESS.

Vaccinul pentru hepatita B trebuie inclus în calendarul vaccinărilor în zonele cu endemicitate ridicată (ceea ce este cazul României). Vaccinarea nou-născuților proveniți de la mame purtătoare de AgHBs este prioritară. Vaccinarea subiecților cu risc profesional și în primul rând a personalului sanitar ar trebui inclusă ca o condiție de exercitare a profesiei.

Vaccinul recombinant s-a dovedit eficient, lipsit de reactogenitate și de complicații. Vaccinarea anti-VHB trebuie integrată în programul vaccinărilor obligatorii în toate țările unde prevalența portajului AgHBs este mai mare de 8%.

CRITERII PENTRU ERADICAREA VIROZELOR PRIN VACCINARE

Evaluarea posibilităților de eradicare a diferitelor viroze grupează argumentele existente în criterii științifice și politico-sociale. În prima categorie se iau în considerare:

- vulnerabilitatea epidemiologică (transmisibilitate, controlul eventualelor rezervoare nonumane de virus, variabilitatea antigenică, posibilitățile de diagnostic);
- condițiile practice de intervenție (vaccin sigur, eficient, ieftin, ușor de administrat);
- probe asupra eradicării obținute în unități geografice izolate (insule, țări, continente).

Criteriile politico-administrative se fundamentează pe:

- costul social al bolii (mortalitate, sechele handicapante, costul spitalizării, costul zilelor de muncă pierdute etc.);
- costul estimat al programului de eradicare (vaccin, sisteme de supraveghere epidemiologică, campanii publicitare);
- alte acțiuni sinergice: igienizarea alimentării cu apă, sanitație, îngrijiri primare.

Bolile virale considerate cu prioritate pentru eradicare până în anul 2010-2025 sunt: poliomielita, rujeola, rubeola, oreionul, hepatita

B. La această listă se adaugă următoarele bacterioze: tetanosul neonatal, difteria, tusea convulsivă.

PROGRESE RECENTE ÎN VACCINOLOGIE

Progresele recente în vaccinologie au condus la numeroase noi strategii de imunizare în scop preventiv sau terapeutic. Noi vaccinuri experimentale se adresează bolilor cu semnificație majoră pentru sănătatea publică: meningoencefalitele virale, noi viroze respiratorii, digestive, infecția HIV/SIDA etc. Vaccinurile candidate cu șanse de a fi introduse în practica curentă pot fi găsite la www.iavireport.org/trialsdb. Rezumând discuția la vaccinurile care și-au demonstrat eficiența și inocuitatea, există 10 vaccinuri care pot proteja împotriva a 14 boli (dintre care 9 viroze). Aceste vaccinuri sunt:

DiTePer (acelular) - este un vaccin trivalent inactivat care asigură protecția împotriva difteriei și tetanosului (prin componentele toxoid) și împotriva tusei convulsive prin antigenele aceluare din Bordetella pertussis. Vaccinul se administrează în cinci doze care se succedă la vârstele de: 2, 4, 6 și 15-18 luni, cu un rapel la 4-6 ani (în unele țări se preconizează și rapeluri suplimentare din 10 în 10 ani). Există numeroase variante ale acestui preparat. De exemplu, pentru copii până la 7 ani este indicat numai vaccinul bivalent diftero-tetic datorită reacțiilor adverse mult reduse comparativ cu vaccinul trivalent. Componenta pertussis este cea mai reactogenă, determinând reacții adverse la o treime dintre vaccinați, mai ales după injecțiile a 4-a și a 5-a. Reacțiile adverse cele mai severe sunt de tip encefalitic. Alte preparate, folosite pentru rapeluri, conțin numai toxoidul tetanic.

Vaccinul anti-hepatită A este un vaccin viral inactivat, conținând virusul hepatitei A cultivat pe culturi celulare, inactivat cu formol și cu alauun ca adjuvant. Vaccinul a fost introdus în 1995 și are o eficiență de peste 95% după schema completă de imunizare. Schema recomandă două perioade: prima, la vârsta de 12-23 de luni, a doua, la 6-18 luni de la prima doză. Vaccinul dă rareori reacții adverse. Nu este inclus în calendarul imunizărilor obligatorii din România. Este însă recomandat după accidente ecologice care compromit calitatea apei potabile (inundații etc.).

Vaccinul anti-hepatită B este un vaccin obținut prin tehnologia ADN recombinant și conține componenta de suprafață a virionului - antigenul AgHBs. Vaccinul a fost introdus din 1986 și a probat o excelentă eficacitate, inclusiv în scăderea incidenței carcinomului primitiv hepatic. Din 1997 este inclus în calendarul imunizărilor obligatorii din România pentru nou-născuți. Vaccinul se administrează intramuscular în trei doze: la naștere, la vârsta de 1-4 luni și la 6-18 luni.

Numai schema completă asigură o seroconversie satisfăcătoare, respectiv, un titru protector al anticorpilor anti-HBs (peste 10 UI). După vaccinare, pot apărea reacții adverse minore locale (până la 10% dintre vaccinați) și/sau febră moderată.

Vaccinul antipoliomielitic este disponibil în două variante: vaccin viu atenuat administrabil per os sau vaccin inactivat concentrat, administrabil în injecții intramusculare. Ambele variante sunt trivalente, adică includ tulpini prototip pentru cele trei tipuri de poliovirusuri.

Vaccinul antirujeolos existent fie ca monovaccin, fie ca bivaccin împotriva rujeolei și oreionului, fie ca trivaccin: împotriva rujeolei, oreionului și rubeolei. Vaccinul este viu atenuat, conținând tulpini hiperatenuate ale celor trei virusuri. Din 1979, vaccinul antirujeolos a intrat în calendarul imunizărilor obligatorii din România fiind administrat după vârsta de 9 luni cu un rapel la 2 ani.

Vaccinul antigripal: există două opțiuni în vaccinarea antigripală: vaccinuri inactivate sau vaccinuri vii atenuate. Fiecare opțiune are avantaje și limite. Conținutul antigenic al vaccinurilor vii și inactivate este identic. În prezent, el cuprinde trei antigene diferite corespunzătoare tulpinilor gripale circulante în sezonul respectiv. Vaccinurile antigripale inactivate folosite interpandemic sunt trivalente și conțin câte 15 mg de antigen hemaglutinant pentru fiecare componentă A/H1N1, A/H2N3 și B. Doza recomandată pentru adulți este unică - 0,5 ml, injecție intramusculară. Pentru copii se recomandă două doze 0,5 ml (numai 0,25 ml pentru cei sub 4 ani) la interval de 4-6 săptămâni. Reacțiile adverse după vaccinul inactivat survin la 15-20% dintre primitori și sunt mai frecvente după preparatele care conțin thimerosal ca stabilizant. Vaccinarea antigripală se face optim în intervalul octombrie-noiembrie. În pandemie, vaccinul folosit va fi monovalent, preparat numai cu tulpina pandemică.

Vaccinurile antigripale sunt reînnoite anual în acord cu tulpinile gripale A/H1N1, A/H3N2 și B, prevalente. OMS recomandă tulpinile care să fie utilizate în producția vaccinului gripal. Aceste recomandări sunt făcute în avans față de sezonul gripal pentru a permite producătorilor prepararea stocurilor sămânță: în februarie pentru emisfera nordică, în septembrie pentru emisfera sudică. Recent, americanii au optimizat o veche tehnologie sovietică din anii '60 recomandând un vaccin viu atenuat administrabil intranasal numit FluMist® MedImmune Inc. Acesta din urmă este recomandat persoanelor sănătoase între 5-49 de ani. Sub și după aceste limite de vârstă se recomandă numai vaccinuri inactivate. Vaccinul FluMist conține mutante virale reci, sensibile la temperatura de 37°C și este complet lipsit de reacții adverse.

Vaccinul anti-Haemophilus influenzae tip B este recomandat copiilor cu afecțiuni respiratorii cronice. Se administrează începând cu vârsta de 2 luni, cu rapeluri la 4, 6 și 12 luni.

Vaccinul antimeningococic există în două formulări - polizaharidic și conjugat. Se administrează adolescenților din zonele cu risc epidemiologic la vârsta de 11-12 ani după o schemă cu trei rapeluri.

Vaccinul antipneumococic se administrează copiilor sub 5 ani sau bătrânilor peste 65 de ani, odată cu vaccinul gripal. Vaccinul există în două formulări - polizaharidic și conjugat.

Vaccinul anti-varicelă este un vaccin viu atenuat, recomandat în două doze la 12-15 luni cu rapel la 4-6 ani.

Vaccin anti-zona zoster este un vaccin viu atenuat, similar celui anti-varicelă însă supradozat, recomandat persoanelor peste 60 de ani

Vaccin antirotaviral este un vaccin viu atenuat, administrabil oral, recomandat în trei doze după vârsta de 2 luni, cu un interval de 4-8 săptămâni între doze.

Sumarul imunizărilor recomandate pentru copii și adolescenți este prezentat în tabelul 12.III.

TABELUL 12.III

SUMARUL IMUNIZĂRILOR RECOMANDATE PENTRU COPII ȘI ADOLESCENȚI
(vezi www.immunize.org)

Vaccin pentru:	Cale de administrare	Schema de imunizare
Hepatita A	im	2 doze la vârsta de 12 și 18 luni
Hepatita B	im	4 doze la vârsta: 0-2-6-18 luni
Difterie-Tetanos-Pertussis	im	5 doze la vârsta: 2-4-6-18 luni și un nou rapel la 4-6 ani
Tetanos-Pertussis	im	pentru rapeluri la fiecare 10 ani
Rujeola-Oreion-Rubeolă	sc	2 doze la vârsta de 12 luni și 4-6 ani
Polio oral sau inactivat	per os/im/sc	4 doze la vârsta: 2-4-6-18 luni
Varicela	sc	2 doze la vârsta de 12-15 luni și la 4-6 ani
Papillomavirusuri oncogene	im	pentru fete după 12 ani
Gripal inactivat sau viu	im/intranazal	2 doze la vârsta de 24 luni și rapel la o lună
Rotavirusuri	oral	3 doze la vârsta: 2-4-6 luni
Haemophilus influenzae B	im	2 doze după 12 ani
Pneumococic	im/sc	2 doze la vârsta de 18-24 luni

Schemele de imunizare sunt recomandate de producătorii de vaccinuri. În general, intervalul între doze este de 4-8 săptămâni. Reacțiile adverse se raportează obligatoriu.

Concluzii

Date fiind beneficiile obținute prin vaccinări atât în termeni sănătății copiilor, cât și al economisirii fondurilor pentru sănătatea pu-

blică, imunizările constituie o măsură prioritară de politică sanitară. Eradicarea variolei, eradicarea previzibilă a poliomielitei și rujeolei au fost obținute cu preparate tradiționale. Dacă este justificat să ne gândim că viitoarele vaccinuri vor fi cele alternative și, în primul rând, cele obținute prin tehnologia ADN recombinant, este prematur să răspundem înainte ca proba timpului să dea un verdict cert.

BIBLIOGRAFIE

- Kaufmann SE.** Novel Vaccination Strategies. Wiley, 2004 - www.wileyeurope.com
Janeway CA. Immunobiology. Garland Sci. Ed. free on line - www.pubmed.gov
Baron S. Medical Microbiology Univ. Texas Med. School 1996 - www.pubmed.gov

Site-uri pe Internet

- www.who.int
www.cdc.gov
www.ecdc.eu
www.immunize.org

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL VIROZELOR

De reținut:

Diagnosticul de laborator al virozelor vizează: (1) izolarea virusului, (2) vizualizarea directă a virusului prin imunoelectronmicroscopie sau microscopie electronică, (3) identificarea antigenelor virale (imuno-fluorescență, imunoenzimatic, imunoaglutinări etc.), (4) identificarea secvențelor genomice specifice cu sau fără amplificare genică și (5) confirmarea serologică.

Diagnosticul virusologic implică reactivi costisitori, tehnologii sofisticate și mână de lucru calificată. Fiind un diagnostic scump, el trebuie solicitat în circumstanțe bine justificate. Iată câteva situații în care necesitatea unui diagnostic virusologic precis se impune:

- boli în care diagnosticul argumentează măsuri terapeutice speciale (exemplu, rubeola în primul trimestru al sarcinii impune avortul terapeutic);
- elucidarea etiologiei virale a unor izbucniri epidemice (meningite, pneumonii, gastroenterite, exanteme);
- supravegherea epidemiologică și urmărirea acțiunilor profilactice;
- monitorizarea tratamentului cu antivirale.

RECOLTAREA PROBELOR

Colectarea produselor destinate diagnosticului (spălătura nazofaringiană, sânge, LCR, fecale, exsudat sau cruste din leziuni cutanate etc.) trebuie făcută la locul și la timpul potrivit.

Aceasta înseamnă cunoașterea unui minim de date privind debutul simptomelor clinice (vechimea lor), circumstanțele infecției, tratamentele încercate etc. Izolarea virusului (standardul de aur al diagnosticului) are șanse de reușită la începutul bolii, anticorpii de tip IgM se pot evidenția la sfârșitul primei săptămâni, iar seroconversia este demonstrată numai prin compararea titrului anticorpilor pe probe

duble de ser (una recoltată la debut, cea de-a doua în convalescență - tabelul 13.I). Probele destinate izolării virusului sunt transportate la laborator în cel mai scurt timp, iar, aici, alegerea sistemului de cultivare depinde de suspiciunea clinicianului privind etiologia bolii. Utilizarea unui mediu de transport se impune ori de câte ori este previzibilă întârzierea transportului sau stocajul în laborator. Componentele mediului de transport sunt: soluție salină fiziologică, o substanță proteică (albumină, gelatină), antibiotice, antifungice, cărbune activat etc.

TABELUL 13.I

RELAȚIA STADIU DE BOALĂ - OPȚIUNE DE DIAGNOSTIC

Stadiu de boală	Izolarea virusului	Seroconversie
Incubație	rară	absentă
Faza acută	frecventă	IgM
Faza de stare	rară	IgM și IgG
Convalescență	absentă	IgG

Nu trebuie omise niciodată regulile de autoprotecție și de protecție a anturajului la recoltarea, transportul și prelucrarea probelor patologice. Acestea sunt infectante și pot contamina operatorul și tot instrumentarul folosit. Măsurile de dezinfecție și de lucru în incinte (hote) izolate trebuie respectate cu strictețe.

Există patru direcții principale de diagnostic virusologic:

- izolarea virală;
- identificarea genomică (diagnostic molecular);
- tehnici microscopice;
- tehnici serologice.

IZOLAREA VIRALĂ

Investigarea oricărei boli virale începe cu găsirea unui sistem de izolare a agentului etiologic. Opțiunea pentru gazda naturală este cea mai logică, însă, în cazul clinicii umane, considerente etice exclud această alternativă. De aceea se folosesc frecvent culturile de celule de origine umană. Orice laborator menține atât linii celulare (cu creștere indefinită in vitro), cât și culturi diploide umane (menținute 30-40 subcultivări, in vitro). Numai în rare cazuri se mai folosesc pentru izolări animalul de laborator sau oul de găină embrionat.

În culturi celulare replicarea virală este recunoscută datorită efectului citopatic (ECP). Tipurile de leziuni produse de diferitele virusuri sunt sintetizate în tabelul 13.II. Pentru virusurile hemagluti-

nante replicarea lor mai este evaluată prin hemadsorbție (rozetarea unei suspensii de hematii în jurul celulelor infectate).

TABELUL 13.II

TIPURI DE EFECT CITOPATIC

Tipuri de ECP		Exemple
sincițial		Paramixovirusuri, HIV
picnotic		Polio, adeno, arbo
incluzionar	intranuclear, acidofil	Papovavirusuri
	intranuclear, bazofil	Adenovirusuri
	intracitoplasmic acidofil	V. rabic, v. vaccinal
	mixt (nucleu + citoplasmă)	V. herpetice, v. rujeolos

Trebuie reținute câteva exemple de incluzii patognomice: în rabie (turbare) - corpii Babeș-Negri, în febra galbenă - incluzii Nicolau-Councilman, în variolă - incluziile Guarnieri.

DIAGNOSTICUL MOLECULAR

Diagnosticul molecular este un domeniu prioritar în multe domenii ale patologiei: boli infecțioase, oncologie, transplant, genetică, medicină legală etc. În bolile infecțioase, introducerea acestor tehnici a însemnat un progres important în diagnosticul unor agenți patogeni care se izolează greu prin tehnicile clasice. Datele obținute permit precizarea subspeciilor sau genotipurilor, cuantificarea exactă, trasarea lanțului epidemiologic etc. De exemplu, în virusologie, precizarea tipurilor de papillomavirusuri izolate a evidențiat rolul oncogen particular a trei virusuri din peste 80 existente. Determinarea încărcării virale a devenit metoda cea mai precisă de evaluare a administrării unor antivirale și un criteriu prognostic major. O aplicație modernă a diagnosticului molecular - *microarray* sau micromozaic - va facilita obținerea unor kituri rapide de diagnostic pentru precizarea etiologiei în afecțiuni clinic identice însă determinate de un spectru larg de agenți patogeni. Probabil că vom dispune în curând de microcipuri care să precizeze etiologia în meningite, encefalite, miocardite etc.

Metodele de diagnostic molecular pentru detecția calitativă și cuantificarea unor microorganisme (bacterii, virusuri, paraziți, fungi) în diferite produse biologice vizează evidențierea acizilor nucleici sau a proteinelor ce intră în alcătuirea microorganismelor respective. Metodele de evidențiere a acizilor nucleici sunt cele cărora le-a fost consacrată denumirea de "metode de diagnostic molecular". Din punct

de vedere tehnic, aceste metode se bazează pe efectuarea în laborator a două etape distincte: (1) extracția acizilor nucleici virali din produsul patologic și (2) detecția, identificarea și cuantificarea (număr de copii) acestor acizi nucleici.

Tehnicile de extracție a acizilor nucleici au cunoscut o dezvoltare continuă, remarcându-se în ultimii ani o tendință de simplificare. Acest lucru a permis pătrunderea tehnicilor de diagnostic molecular în laboratoare apropiate de patul bolnavului. În prezent, tehnicile de extracție au în vedere obținerea unui material nu neapărat pur din punct de vedere chimic, ci integru, neclivat, apt să poată fi utilizat optimal în cea de-a doua etapă. Simplificarea extracției acizilor nucleici a permis îndeplinirea unei cerințe majore în diagnosticul de laborator clinic, anume **standardizarea**. Cu cât o tehnică implică mai puține manopere, cu atât reproductibilitatea ei este mai bună și șansele de standardizare mai mari. Simplificarea din punct de vedere tehnic a fost posibilă și datorită progreselor importante obținute în domeniul reactivilor folosiți pentru tehnicile de extracție. O clasificare generală a tehnicilor de extracție a acizilor nucleici are la bază tipul principal de acid nucleic ce se urmărește a fi obținut. Tehnicile de extracție a ADN sunt principal diferite de cele pentru extracția ARN. Cu toate acestea, schema generală a extracției ARN și ADN în vederea diagnosticului molecular parcurge aceleași patru procese distincte: liza, precipitarea, spălarea și dizolvarea. Tot mai frecvent, diagnosticul molecular vizând moleculele de ADN se rezumă la etapa de liză, materialul obținut fiind suficient de bun pentru efectuarea detecției atât prin metode de amplificare, cât și prin metode bazate pe hibridizarea cu sonde specifice. Bacteriile, paraziții și fungii au în compoziția lor ambele tipuri de acizi nucleici, în timp ce virusurile dispun doar de un singur tip, ARN sau ADN. Deoarece moleculele de ARN sunt mult mai instabile in vitro, dezoxiribovirusurile au fost ținta preferențială a diagnosticului molecular. Alte clasificări ale metodelor de extracție au în vedere calitatea și, mai exact, puritatea materialului obținut, în conformitate cu exigențele metodelor de detecție ce se au în vedere ulterior. În situații particulare, metodele așa-zise in situ, nevoia de preservare a organizării tisulare și a structurilor celulare fac ca etapa de extracție a acizilor nucleici să fie deosebită conceptual. Aceste metode se realizează pe suport plan, de regulă lame de sticlă, pe care este etalat țesutul în secțiune micrometrică, "extracția" limitându-se în esență la o liză blândă, care să permită doar expunerea acizilor nucleici în raport cu reactivul de detecție vizat. În tabelul 13.III sunt prezentate principiile generale ale metodelor de prelucrare a eșantioanelor recoltate de la pacienți în vederea diagnosticului molecular.

TABELUL 13.III

PRELUCRAREA PROBELOR PENTRU EFECTUAREA PCR

Principiu	Metode
Liza celulară de tip termomecanic	Încălzirea la 95° C Congelarea-decongelarea repetată
Liza celulară cu digestie proteică	Detergenții (Sodium Dodecil Sulfat) Proteazele (proteaza K) Agenții chaotropici (tiocianatul de guanidină) etc.
Concentrarea acizilor nucleici	Ultracentrifugarea Precipitarea cu etanol/izopropanol
Extracția și purificarea acizilor nucleici	Metoda fenol-cloroform Coloanele cu centrifugare sau vacuum Absorbția pe silicați Separarea cu bile magnetice

Metodele de liză celulară, concentrare și extracție pot fi combinate. Timpul necesar prelucrării variază între 10 minute (liza mecanică) și mai mult de o oră (digestia cu proteaza K și/sau procedee complexe de extracție, cum ar fi metoda cu fenol-cloroform). Volumul de probă necesar variază între câțiva microlitri (de exemplu pentru liza mecanică) până la 1 ml (metodele de concentrare).

Tehnicile de detecție a acizilor nucleici virali au la bază cel puțin una din următoarele variante tehnice:

- hibridizarea cu sonde specifice,
- amplificarea enzimatică cu primeri specifici (PCR în diferite variante) sau
- secvențierea.

De departe cea mai comună metodă de detecție utilizată în prezent este cea cunoscută sub denumirea de *polymerase chain reaction*, PCR. Ceea ce a făcut din PCR o metodă deosebit de accesibilă a fost performanța ei în raport cu cele două cerințe majore ale unui test de diagnostic: sensibilitatea și specificitatea. Deși de la descoperirea PCR nu au trecut decât două decade, metoda a cunoscut o dezvoltare fără precedent, aplicațiile ei fiind la baza celor mai spectaculoase descoperiri ale epocii moderne, incluzând aici descifrarea genomului uman și a genomului altor numeroase organisme vii, ca și diagnosticul rapid și exact al numeroase infecții și boli genetice. Clasic, PCR decurge în 3 etape majore: denaturarea dublului helix, adiția primerilor și elongația lanțului.

Denaturarea vizează desfacerea ADN dublucatenar (ADNdc) prin încălzirea la o temperatură de minim 95°C, care determină ruperea

legăturilor dintre bazele complementare ce alcătuiesc lanțurile antiparalele de ADNdc.

Adiția reprezintă o hibridizare a moleculelor amorsă (primer) pe catenele de ADN țintă. Primerii sunt lanțuri oligonucleotidice (20-30 de baze nucleotidice) sintetizate artificial, având secvența aleasă de așa manieră încât să poată recunoaște cu specificitate maximă tipul de ADN căutat. Orice test PCR are nevoie de o pereche de astfel de primeri, unul destinat catenei sens și celălalt destinat catenei antisens. La desemnarea lor se are în vedere nu doar specificitatea pentru ADN țintă, dar și flankarea cu secvențele lor a unui fragment de ADN țintă care să poată fi amplificat și, ulterior, evidențiat în condiții optime. În mod obișnuit, între cei doi primeri se delimitează un fragment de câteva sute de baze (100-1 000). Un alt parametru important este alegerea temperaturii la care se va desfășura alinierea primerilor, aceasta fiind critică pentru gradul de specificitate al testului. Compoziția în baze a celor doi primeri este decisivă pentru definirea temperaturii optime a alinierii, ea fiind situată între 45 și 65°C. Cu cât temperatura de aliniere este mai mare, cu atât crește și stringența reacției și, reciproc, cu cât temperatura de aliniere este mai mică, cu atât șansele de a avea amplificări nespecifice sunt mai mari.

Elongația lanțului este o etapă enzimatică în care polimeraza ADN prezintă în mediul de reacție va efectua sinteza unor catene noi, complementare ADN-ului țintă. Sinteza este inițiată din zonele de legare a primerilor, capetele de ADNdc rezultate din hibridizarea primer - ADN țintă fiind situsurile de activitate enzimatică ale polimerazelor ADN. Polimerazele ADN utilizate în PCR sunt de origine bacteriană și au de îndeplinit o cerință esențială, anume, să fie stabile la temperaturile mari din cursul etapei de denaturare. Astfel de polimeraze sunt prezente în bacteriile termofile, activitatea polimerazică desfășurându-se la circa 72°C. Repetarea ciclică a etapelor de denaturare, aliniere și elongare permite dublarea la fiecare ciclu a cantității de ADNdc delimitat de cei doi primeri din structura ADN țintă. După 35-40 de cicluri, consumarea amestecului de reacție (dezoxinucleotidele fosforilate, dNTP) și degradarea enzimei face ca amplificarea să intre într-un platou. Cantitatea de ADN nu mai crește, astfel că reacția este stopată. Parcurgerea ciclurilor de temperatură de către materialul cercetat și amestecul de reacție se realizează în tuburi de plastic amplasate în aparate programabile de ciclare termică, *termocyclere*. Performanțele tehnice ale acestor aparate (viteza de realizare a țintei termice, exactitatea temperaturii țintă, uniformitatea termică în interiorul tubului etc.) pot influența decisiv performanțele testului PCR. Influențe importante generează și calitatea reactivilor utilizați (în extracție și amplificare), precum și calitatea manoprelor executate. În urma ciclării prin PCR obținem o cantitate mare de ADN țintă de 2^N cicluri. Scopul urmărit este însă acela de a evi-

denția acest ADN. Clasic, evidențierea se face prin migrarea orizontală în gel de agaroză a ADN amplificat și marcarea acestuia cu un agent fluorescent, bromura de etidiu. Iluminarea gelurilor cu lumină ultravioletă permite vizualizarea ADN amplificat sub forma unor benzi care se depărtează de punctul de pornire al electroforezei invers proporțional cu greutatea fragmentului: fragmentele mici vor migra mai departe de punctul de start, fragmentele mai mari vor migra mai aproape. Simultan cu materialul obținut din amplificarea PCR în gelul de electroforeză se pun la migrat și markeri de greutate moleculară (amestecuri de molecule de ADN a căror dimensiune sau greutate moleculară este cunoscută), astfel că este posibilă aprecierea dimensiunilor fragmentelor obținute din PCR. Acest lucru este necesar pentru a confirma cu exactitate că în urma testului PCR am amplificat exact fragmentul de interes, anume acela delimitat în secvența ADN țintă de cei doi primeri folosiți. Pentru că metoda evidențierii prin gel este laborioasă și dificil de utilizat în aplicații cantitative, metodele moderne, în special cele standardizate și comercializate pentru diagnostic in vitro, utilizează metode de evidențiere a ADN amplificat bazate pe hibridizare cu sonde marcate. Revelarea urmează hibridizării cu măsurarea luminometrică sau chemoluminometrică a unui substrat modificat proporțional cu cantitatea de sondă implicată în hibridizarea cu ADN rezultat din PCR.

Din varietatea de tehnici care se bazează pe hibridizarea acizilor nucleici pentru determinarea unei secvențe genomice virale bine definite menționăm:

- Southern blot analysis.
- Northern blot.
- Spot hybridization.

Tehnica Southern blot (de la numele descoperitorului Ed Southern) compară fragmentele ADN rezultate dintr-o secvență lungă, clivată cu enzime de restricție. Enzimele de restricție sunt endonucleaze care scindează dublul helix în urma atașării la situsuri de clivare constituite, în general, din secvențe scurte, de 6-8 baze azotate, într-o anumită ordine. Situsul de clivare fiind totdeauna același, rezultă fragmente cu anumite lungimi, caracteristice fiecărui genom viral. Identificarea se face după separarea prin electroforeză în gel SDS - poliacrilamidă prin compararea profilului electroforetic al probei și martorilor. Eventual, după separarea electroforetică, se poate proceda la transferul și imobilizarea fragmentelor pe hârtie de nitroceluloză. Identificarea în acest caz se face utilizând o sondă moleculară solubilă marcată, complementară. Hibridizarea ADN-ADN se cheamă **Southern blot**, hibridizarea ARN-ARN - **Northern blot**, în timp ce recunoașterea imunologică a unei probe proteice, de asemenea imobilizată pe nitroceluloză, se numește **Western blot**.

Tehnica Spot hybridization poate determina și prezența unei secvențe genomice virale specifice in situ, în preparate histologice obținute din probe recoltate direct din organismul infectat. Se folosește tot o sondă moleculară solubilă, complementară însă într-o variantă tehnică care sporește sensibilitatea reacției: *sandwich hybridization*. Tehnica hibridizării sandwich utilizează două fragmente separate de acid nucleic. Ambele fragmente conțin secvențe complementare acidului nucleic care urmează a fi identificat și, în plus, conțin puține secvențe comune. Unul dintre fragmente este imobilizat pe nitroceluloză, celălalt este sondă moleculară solubilă marcată.

Avantajul tehnicii sandwich este că alte substanțe prezente în probă: proteine, mucopolizaharide, lipide nu interferează cu legarea specifică între secvențele de ADN complementare.

Avantajele reacțiilor de identificare genomică constau în:

- sensibilitate superioară în raport cu reacția antigen - anticorp ca urmare a stabilității legăturilor de H dintre perechile de baze, legături neinfluențate de alte componente chimice ale sistemului;
- specificitate extremă putând discrimina o singură bază diferită dintr-o secvență de 20 de baze;
- stabilitatea probei care se pretează la diagnostic chiar după tratamente brutale, ca extracția ADN, tratament proteolitic sau denaturări termice;
- standardizarea reactivilor utilizați - sondele moleculare pot fi preparate prin bioinginerie.

ALTE TEHNICI "CLASICE" ÎN DIAGNOSTICUL VIRUSOLOGIC

Microscopia. Tehnicile de colorare histologică sau histochimică se folosesc din ce în ce mai rar în diagnosticul virusologic, dată fiind lipsa de specificitate a leziunilor din viroze. În plus, vizualizarea corpusculilor infectanți cu microscopul optic nu este posibilă decât pentru virionii din familia poxviridae (grupul variola-vaccina) sau pentru chlamydii și rickettsii. Microscopul electronic continuă încă să aducă informații prețioase datorită ameliorărilor tehnologice. Spre exemplu, tehnica colorăției negative a preparatelor virale (mai ales după agregarea virionilor tratați cu seruri specifice) este utilă în diagnosticul de laborator al multor viroze. Imunoelectronmicroscopia este o altă metodă sensibilă și specifică de vizualizare a particulelor infectante. Se folosesc anticorpi marcați cu substanțe electronoapace (feritina, Au coloidal), care recunosc specific celulele infectate. În imunoelectronmicroscopie ca și în imunofluorescență se folosesc două variante tehnice majore: tehnica directă (cu anticorpi antivirali marcați) și tehnica indirectă (cu anticorpi antispécie marcați).

Imunofluorescența. Este metoda microscopică de diagnostic virusologic rapid cu cea mai largă folosire. Simplitatea metodei și reactivii ușor de procurat au conferit imunofluorescenței o accesibilitate largă. Tehnica este foarte indicată în diagnosticul virozelor mono-specifice (variolă, rabie, rujeolă, oreion etc.), putând determina fie prezența antigenului specific, fie a anticorpilor.

Tehnica directă presupune folosirea anticorpilor antivirali cuplați cu fluorocrom (fluoresceină sau rhodamină). Aceste substanțe se cuplează în domeniul Fc al moleculei de imunoglobulină, lăsând nealterat situsul de recunoaștere a antigenului. Fluorocromii au proprietatea de a emite o anumită lungime de undă când sunt excitați cu un spot luminos din domeniul ultraviolet al spectrului. Dotarea laboratorului cu un microscop cu o sursă de lumină în U-V este singura cerință deosebită pentru aplicarea imunofluorescenței.

Tehnica indirectă se realizează în două etape succesive:

- cuplarea antigenului cu anticorpi antivirali nemarcați preparați pe o anumită specie de animal (exemplu, iepure, capră, șoarece);
- recunoașterea anticorpilor de iepure care rămân legați de antigenul corespunzător (în ciuda unor spălări prelungite) cu un al doilea strat de anticorpi-antispecie, de această dată marcați cu fluorocrom. Tehnica indirectă are un grad mai mare de specificitate. Efectuarea mărilor de "stingere" a fluorescenței permite evitarea reacțiilor fals pozitive.

Serologia. Diagnosticul serologic cuprinde o diversitate de tehnici care permit stabilirea grupului sau tipului de virus cu grad diferit de sensibilitate (tabelul 13.IV).

TABLELUL 13.IV

CARACTERISTICI ALE TEHNICILOR SEROLOGICE CURENTE

Reacții	Specificitate de grup	Specificitate de tip	Sensibilitate de grup	Sensibilitate de tip
FC	+	-	redușă	redușă
IF	++	++	redușă	redușă
ID, IEM	+	+	redușă	întă
HI, SN, RIA, EIA	+++	+++	întă	întă

Legendă: FC - reacția de fixare a complementului; IF - imunofluorescență; ID - imunodifuzie; IEM - imunoelectronomicroscopie; HI - hemaglutinoînhibare; SN - seroneutralizare; RIA - radioimunoanaliză; EIA - reacție imunoenzimatică.

Progresele tehnologice recente în serologie constând în miniaturizarea și automatizarea tehnicilor, ca și orientarea către tehnici rapide (IF, EIA, RIA) au modificat ponderea utilizării tehnicilor clasice (HI,

FC, SN). Fiecare tehnică serologică poate decela fie antigenul, fie anticorpii antivirali, iar variantele utilizate sunt extrem de diverse.

Pentru exemplificare vom prezenta 4 variante ale tehnicii EIA, în care anticorpii sunt cuplați cu un marker enzimatic (cel mai frecvent peroxidaza sau fosfataza alcalină) care urmează a fi evidențiat printr-o reacție de culoare la adăugarea substratului. Reacția poate fi citită cu ochiul liber sau cu spectrofotometrul existând în fiecare trusă de reactivi martori pozitivi, negativi și de prag. În instrucțiunile fiecărei truse sunt precizate criteriile de validare a probei (respectiv, raportul valorilor absorbantei citite la spectrofotometru pentru probele pozitive și negative) și criteriile de pozitivitate (de regulă, pornind de la valorile probelor prag sau pozitive la limită), (în engleză, prag - "cut-off").

Pentru depistarea anticorpilor în EIA sunt folosite două alternative: tehnica de competiție și cea indirectă. În ambele antigenul este peliculizat pe fundul godeurilor din plăcile de plastic ale trusei. În tehnica de competiție se adaugă simultan proba (conținând anticorpi sau nu) și anticorpi antivirali cuplați cu enzima. Dacă proba conține anticorpi, aceștia vor bloca atașarea de antigenul din godeu a anticorpilor marcați cu enzimă. Valorile absorbantei pentru probele pozitive sunt mai mici decât la martorul negativ.

În tehnica indirectă se adaugă succesiv proba și, în al doilea timp, anticorpi anti-om cuplați cu enzimă. Dacă anticorpii umani din probă recunosc antigenul, ei rămân fixați în godeu (în ciuda spălărilor) și vor fi recunoscuți de anticorpii anti-om cuplați cu enzima. Valorile absorbantei pentru probele pozitive sunt mai mari decât la martorul negativ.

Depistarea anticorpilor de tip IgM se face printr-o tehnică de "captură". În primul timp, în godeul care conține anticorpi anti-IgM umani sunt capturați din probă toate imunoglobulinele M. Urmează determinarea specificității antivirale a acestor anticorpi prin adăugarea antigenului viral cuplat cu enzima. Reacția specifică este decelată tot prin reacția de culoare, după adăugarea substratului enzimei.

Depistarea antigenului din probă se face pe plăci peliculizate cu anticorpi monoclonali care recunosc și fixează numai o parte din determinanții antigenici. Determinanții rămași liberi vor fi recunoscuți de un al 2-lea anticorp monoclonal conjugat cu enzima.

Tehnica EIA, ca și alte reacții serologice (RIA) sau reacțiile de identificare genomică, beneficiază de un spor de sensibilitate prin folosirea sistemelor de amplificare. Un exemplu de sistem de amplificare este cuplarea cu biotină a unuia din reactanți și evidențierea lui prin conjugatul avidină-enzimă. Sistemul avidină-biotină este remarcabil prin afinitatea de cuplare care merge la diluții de 10^{15} , permițând detectarea de picograme de reactanți.

METODE DE DIAGNOSTIC VIRUSOLOGIC RAPID

În anii din urmă, evidențierea directă a antigenelor virale a devenit posibilă prin metode rapide, care dau rezultatul în mai puțin de 30 de minute. Testele rapide de diagnostic sunt teste imunoenzimatică și, în funcție de performanțe, numai detectează antigenele virale sau detectează și diferențiază tipurile de virus.

Colectarea eșantioanelor pentru diagnosticul rapid trebuie făcută cât mai timpuriu după debut și nu după 4-5 zile, când eliminarea de virus scade. Complexitatea testelor rapide de diagnostic a determinat împărțirea lor în trei categorii:

- teste simple, exceptate de la rigorile acreditării ("*CLIA waived*", vezi mai jos),
- teste relative simplu de efectuat și interpretat, destinate cabinetelor medicale,
- teste moderat complexe, care se utilizează în laboratoare specializate și necesită o anumită expertiză.

În Statele Unite, "*The Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA)*" stipulează că fiecare laborator trebuie acreditat pentru fiecare test efectuat. Numai laboratoarele atestate pot efectua testele care sunt decontate de Medicare sau Medicaid (Casa de Asigurări de Sănătate). Teste simple (cum sunt unele teste de diagnostic rapid în gripă) sunt exceptate de la acest deziderat (*CLIA waived*), încât ele pot fi efectuate și în alte unități, de exemplu, în cabinete de consultații sau camere de gardă fiind, de asemenea, integral decontate.

TABELUL 13.V

RATA DE POZITIVITATE CU DIFERITE METODE

Metoda	Nr. rezultate pozitive/nr. total probe	Procente
RT-PCR	80/143	55,9
Izolare în culturi	79/143	55,2
RT-PCR și izolare	83/143	58
Test rapid	56/135	41,5*

*semnificativ statistic ($P < 0,05$).

OMS face următoarele recomandări privind utilizarea testelor rapide:

- în perioadele interepidemice testele rapide pozitive trebuie confirmate prin IF sau izolare virală sau RT-PCR (tabelul 13.V);
- supravegherea epidemiologică nu se poate baza numai pe testele rapide;

- în perioadele epidemice testele rapide nu aduc un suport esențial deciziei clinice; ele vor fi utilizate numai când pot influența managementul unui anumit pacient,

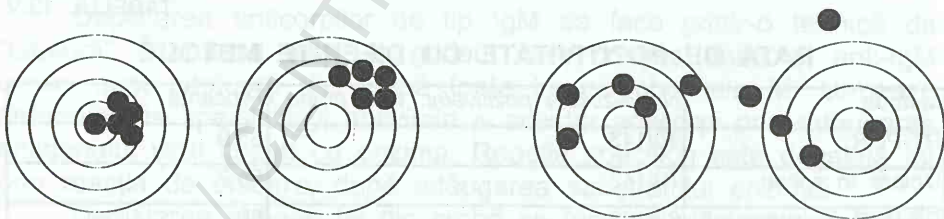
- educația personalului de laborator privind metodele și limitele testelor rapide este esențială, dată fiind complexitatea unora.

PERFORMANȚELE TESTELOR DE DIAGNOSTIC

Totdeauna un test de diagnostic nou se interpretează în raport cu un test deja utilizat, socotit testul standard. Criteriile care se apreciază sunt (fig. 13.1):

- Validitatea - măsoară testul ceea ce urmărim?
- Reproducibilitatea (precizia) - rezultatele repetate se încadrează într-un domeniu îngust de variație? Precizia măsurătorilor se referă la precizia (acuratețea) testului și a aparatului utilizat. Precizia depinde de distribuția întâmplătoare a erorilor. Măsurarea preciziei este exprimată în termenii impreciziei. Imprecizia se determină prin distribuția statistică a valorilor măsurate repetat (triplicat, de obicei), și anume prin coeficientul de variație (CV). $CV = \frac{\text{Deviația standard}}{\text{media}}$.

- Repetabilitatea trebuie apreciată numai în cazul păstrării aceluiași condiții: același aparat, același operator (executant), același producător de reagenți, același laborator etc. Reproducibilitatea se referă la rezultate obținute în condiții schimbate, în diferite laboratoare dar cu seturi (paneluri) de eșantioane (probe) identice. Probele se aleg astfel încât să cuprindă probe negative, pozitive și cu valori diferite între aceste două extreme.



Valid și reproducibil. Reproducibil dar nu valid. Valid, nereproducibil. Nici valid nici reproducibil

Fig. 13.1. Reprezentare vizuală a validității și reproducibilității prin asemănare cu performanțele unei arme de tras la țintă.

Sensibilitatea și specificitatea sunt indicatorii esențiali pentru calitatea oricărui test. Validitatea unui test se apreciază în funcție de concordanța cu rezultatele obținute pe probe standard sau de referință. În bolile infecțioase, aceste standarde sau calibratori sunt furnizate de OMS sau de agențiile naționale de acreditare.

Testul trebuie să fie pozitiv la cei ce au o afecțiune anumită (numiți în continuare bolnavi) și negativ la cei ce nu au această afecțiune (numiți în continuare sănătoși). Tabelul 13.VI A servește la calcularea celor doi parametri esențiali pentru calitatea oricărui test:

- Sensibilitatea - (S) - cât de sensibil este testul în detecția bolnavilor.

- Specificitatea - (sp) - cât de sensibil este testul în a fi negativ la cei ce nu au boala.

$$S = a/a+c \quad sp = d/b+d$$

Cele două valori sunt opuse diagonal.

TABEL 13.VI

MODUL DE CALCUL AL SENSIBILITĂȚII ȘI SPECIFICITĂȚII

Tabelul 13.VI A		Nr. bolnavi	Nr. sănătoși	Total
	Nr. pozitivi	a=pozitivi reali	b=fals pozitivi	a+b
	Nr. negativi	c=negativi reali	d=fals negativi	c+d
	Nr. total	a+c	b+d	a+b+c+d

S și sp se cuantifică în raport cu testul standard, ca în exemplul următor, în care au fost testați 100 de bolnavi și 100 de sănătoși diagnosticați cu testul standard (tabelul 13.VI B):

Tabelul 13.VI B		Nr. bolnavi	Nr. sănătoși	Total
	Nr. pozitivi	90	5	95
	Nr. negativi	10	95	105
	Nr. total	100	100	200

În acest exemplu (tabelul 13.VI B) sensibilitatea este 90%, iar specificitatea 95%. Observăm că 10 subiecți sunt fals negativi, iar 5 subiecți sunt fals pozitivi.

Dacă testele pe care le avem la dispoziție nu sunt precise este bine să utilizăm simultan sau seriat cel puțin două teste. În circumstanțe care nu reclamă decizii terapeutice urgente testele se vor efectua în serie, începând cu testul cu precizie mare pentru a rămâne cu mai puțini fals pozitivi la al doilea test.

În plus, S și sp se cuantifică în raport cu frecvența bolii în populație (prevalența) determinând valorile predictive:

- valoarea predictivă a unui test pozitiv este: $VPP = a/a+b$ (câți pozitivi se regăsesc între bolnavi);

- valoarea predictivă a unui test negativ este: $VPN = d/c+d$ (câți negativi se regăsesc între sănătoși).

De exemplu, dacă testul se utilizează într-o **populație neselectată** (într-o gară, să presupunem, luând călătorii la întâmplare) putem avea următorul rezultat (tabelul 13.VI C):

Tabelul 13.VI C		Nr. bolnavi	Nr. sănătoși	Total
	Nr. pozitivi	19	99	118
	Nr. negativi	1	1 881	1 882
	Nr. total	20	1 980	2 000

Altfel spus, într-o populație cu prevalență joasă 20 din 2 000 (1%) sunt bolnavi, iar testul nostru (de triaj) detectează 19 pozitivi și un negativ între cei 20 de bolnavi. Aplicând valori de 95% pentru **S** și **sp** înseamnă că 1 980 nu au boala, dar numai 95% dintre ei sunt negativi (1 881), iar restul până la 2 000 (99), sunt pozitivi. Deci, numărul total la pozivilor este $19 + 99 = 118$, dar dintre ei numai 16% sunt bolnavi. Ceilalți 84% sunt fals pozitivi cu testul analizat, care are o valoare predictivă a testului pozitiv slabă. Valoarea predictivă a testului negativ este bună, apropiindu-se de 100%.

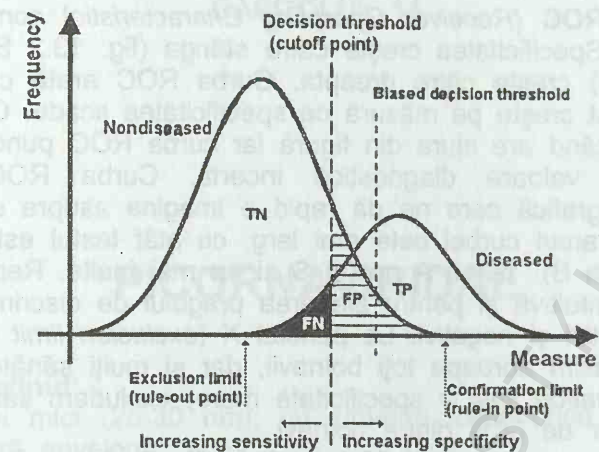
Dacă același test este utilizat în vederea confirmării diagnosticului într-o **populație restrânsă**, dar cu simptomatologie sugestivă, putem obține cu totul alte cifre pentru valorile predictive. Din 100 de subiecți testați, 60 sunt bolnavi (clinic), iar testul cu **S** și **sp** 95% dă 57 rezultate pozitive pentru 59 de pacienți, adică valoarea predictivă a testului pozitiv este 97%, iar valoarea predictivă a testului negativ este 93% (tabelul 13.VI D).

Tabelul 13.VI D		Nr. bolnavi	Nr. sănătoși	Total
	Nr. pozitivi	57	2	59
	Nr. negativi	3	38	41
	Nr. total	60	40	100

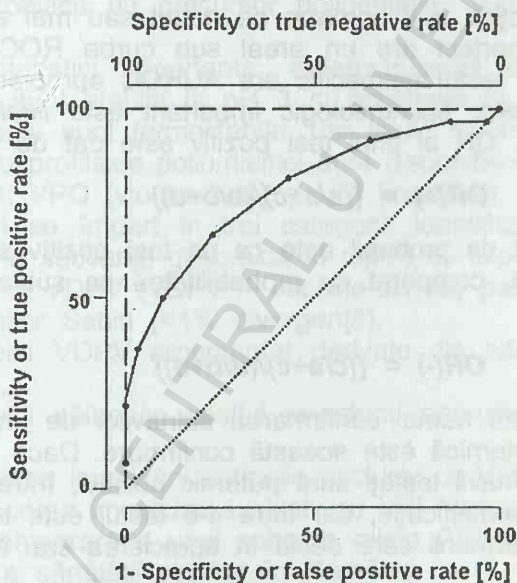
În concluzie, dacă urmărim să diagnosticăm o boală cu prevalența mică trebuie să utilizăm inițial un test cu **sp** mare >99,9%. Invers, **S** este importantă atunci când prevalența este mare, iar un rezultat negativ nu dă certitudinea absenței bolii.

Testul patognomonic sau testul standard "de aur" în diagnostic este izolarea virusului. El asigură proba decisivă (ideală) pentru diagnostic și împarte subiecții în bolnavi (TP - adevărați pozitivi) și sănătoși (TN - adevărați negativi). Celelalte teste dau o imagine mai apropiată de practică și de excepțiile proprii biologiei, și vorbesc de pozitivi reali sau negativi reali. În acest limbaj nuanțat:

- sensibilitatea = pozitivi reali/pozitivi reali + fals negativi
- specificitatea = negativi reali/negativi reali + fals pozitivi.



2A



2B

Fig 13.2. Relația dintre specificitate și sensibilitate este în funcție de alegerea valorii prag (*cut-off*) care poate îngloba mai mulți falsi negativi (FN) în caz de valoare prag mică sau mai mulți falsi pozitivi (FP) - valoare prag mare. În fig. 13.2 B arealul sub curba ROC (AUROC). Testul ideal are AUROC egal cu 1, testul imperfect AUROC apropiat de 0,5. Vezi detalii în text.

S și **sp** iau valori diferite în funcție de poziția valorii prag (fig. 13.2). Pentru confirmarea prezenței bolii în populație se alege un test cu **sp** mare. Pentru excluderea prezenței bolii în populație se alege un test cu **S** mare.

Curba ROC (*Receiver Operating Characteristic*) combină efectul **S** și **sp**. Specificitatea crește către stânga (fig. 13.2 B) și sensibilitatea (1-sp) crește către dreapta. Curba ROC arată că sensibilitatea unui test crește pe măsură ce specificitatea scade. Curba ROC este optimă când are alura din figură iar curba ROC punctată indică un test cu valoare diagnostică incertă. Curba ROC este o reprezentare grafică care ne dă rapid o imagine asupra calității testului. Cu cât arcul curbei este mai larg, cu atât testul este mai bun (A mai bun ca B). Testul A are și **S** și **sp** mai înalte. Reprezentarea grafică este intuitivă și pentru alegerea pragului de discriminare (*cut-off*) între pozitivi și negativi. La punctul X (*exclusion limit* = sensibilitate mare) găsim aproape toți bolnavii, dar și mulți sănătoși pozitivi. La Z (*confirmation limit* = specificitate mare) excludem sănătoșii, dar pierdem în jur de 50% dintre bolnavi.

Populația nu este alcătuită numai din "foarte bolnavi" sau "foarte sănătoși", ci și din stadii intermediare (în raport, de exemplu, cu stadiul evolutiv al infecției: mai aproape de debut sau mai aproape de vindecare). Testul perfect are un areal sub curba ROC (AUROC) apropiat de unitate, testul nespecific are AUROC apropiat de 0,5.

Un alt parametru epidemiologic important este *likelihood ratio* sau *odd ratio* (OR). OR al unui test pozitiv este dat de formula:

$$OR(+) = \{(a/a+c)/(b/b+d)\}$$

OR+ arată cât de probabil este ca un test pozitiv să însemne o persoană bolnavă, comparat cu probabilitatea ca subiectul să fie sănătos. Opus,

$$OR(-) = \{(c/a+c)/(d/b+d)\}$$

OR nu ne arată numai confirmarea bolnavilor de un test pozitiv, dar și cât de puternică este această confirmare. Dacă OR a unui test este <1 toți bolnavii testați sunt puternic pozitivi, între 1-3 testul pozitiv are încă o semnificație, dar între 4-6 testul este total incert.

În concluzie, termenii care decid în aprecierea sau cumpărarea unui test sunt:

- validitatea și reproductibilitatea;
- sensibilitatea și specificitatea;
- prevalența bolii de diagnosticat și valorile predictive;
- raportul de probabilitate sau odd ratio (OR).

Surse pe Internet privind diagnosticul gripei

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm>

<http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.html>

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.

PICORNAVIRIDAE

De reținut:

Virioni mici (25-30 nm), cu simetrie icosaedrică, 60 de capsomere, fără anvelopă.

Genom ARNss, cu polaritate pozitivă, infecțios, nesegmentat. Genomul codifică un precursor polipeptidic, ulterior clivat în 4 proteine.

Caracteristici importante: enterovirusurile sunt nediferențiable morfologic, sunt stabile la pH 3 și rezistente la inactivarea cu eter. Rhinovirusurile sunt termostabile, dar labile la pH acid.

Pentru profilaxia poliomielitei sunt disponibile două feluri de vaccin trivalent: VPO (viu atenuat) și VPI (inactivat). Izolatele recente de poliovirusuri se împart în trei categorii, identificate după gradul de divergență în secvența genomică în raport cu tulpinile atenuate Sabin:

- tulpini VDPV (VDPV = *vaccine-derived polioviruses*) seamănă toare tulpinilor Sabin (<1% divergență),
- tulpini VDPV argumentat derivate din tulpinile Sabin (1-15% divergență),
- tulpini sălbatice posibil revertanți neurovirulenți (>15% divergență).

Înlocuirea imunizării antipolio exclusiv cu VPO (vaccin polio oral) prin introducerea imunizării exclusiv cu VPI (vaccin polio inactivat) sau aplicarea temporară a unei scheme mixte (VPI urmat de VPO) este o urgență a sănătății publice în România.

Istoric. Poliomielite a fost una din virozele de temut. Chiar și azi, handicapați motor plătesc tribut lipsurilor în strategia vaccinării antipolio. Vaccinurile poliomielitice inactivat (Salk) și viu atenuat (Sabin) sunt momente remarcabile în evoluția medicinei și strategiile moderne, ameliorate, de producție și administrare promit eradicarea poliomielitei. Virusul febrei aftoase, un patogen important pentru multe animale domestice (porcine, ovine, bovine etc.) a fost primul virus animal izolat (Loeffler și Frosch, 1898). Descoperirea virusului poliomielitice datează din 1909 (Landsteiner și Popper), iar cultivarea

virusului se leagă de numele lui Constantin Levaditi. În 1939, Armstrong adaptează tulpina Lansing la șobolanul de bumbac și apoi la șoarece. În 1949, Enders, Weller și Robbins (premiul Nobel) cultivă aceeași tulpină in vitro, pe celule de embrion uman. Această descoperire stimulează căutările pentru prepararea unui vaccin. În 1953, Jonas Salk se autoinoculează cu vaccinul inactivat pe care l-a preparat, iar, în 1959, Albert Sabin testează cu succes vaccinul viu la maimuță. În 1981, în S.U.A. a fost raportat ultimul caz indigen de poliomielită naturală, iar în 1990, OMS își propune eradicarea poliomielitei după 2000.

Studiile moderne de biologie moleculară continuă să evidențieze importanța picornavirusurilor ca modele experimentale care au condus la descoperiri remarcabile: polimeraza ARN dependentă de ARN, diferențele în traducere între sisteme pro- și eukariote, importanța cli-vajului proteolitic în maturarea particulelor virale infectante etc.

CLASIFICARE

Familia picornaviridae constituie un grup extrem de mare de virusuri care parazitează nu numai animale, dar și plante sau bacterii. Trei genuri sunt implicate în patologia umană: enterovirus, heparnavirus și rhinovirus. Din genul enterovirus fac parte virusurile polio, Cocksackie și ECHO (*enteric cytopathogenic human orphan*). Între aceste subgenuri nu sunt diferențe semnificative, toate determinând obișnuit infecții subclinice (inaparente) ale tractului digestiv, dar și un spectru larg de alte sindroame. Un al patrulea gen grupează patogeni majori pentru medicina veterinară - virusurile febrei aftoase - care determină epidemii la toate speciile importante economic: porci, oi, cai, bovine etc. (tabelul 14.1)

TABELUL 14.1

CLASIFICAREA ENTEROVIRUSURILOR UMANE

Grup	Specii	Boli determinate	
		frecvent	rar
Polio	3	Poliomielită	Meningite
Cocksackie	A1-A24	Meningite, faringite, exanteme	Infecții respiratorii
	B1-B6	Boala Bornholm, exanteme	Miocardite, enterite, pancreatite etc.
ECHO	1-33	Infecții respiratorii	Exanteme
neclasificate	Entero 68-71	Encefalite, mieloradiculonevrite	Conjunctivite hemoragice - Entero 70

Împărțirea de mai sus corespunde tropismului: polio infectează numai primatul; Coxsackie infectează și șoarecele nou-născut iar ECHO numai culturile de celule. Alte clasificări iau în considerare receptorii virali. De exemplu, polio are ca receptor moleculele ICAM (*intercellular adhesion molecule-1*) din superfamilia imunoglobulinelor (fig. 14.1), iar unele virusuri ECHO molecule din familia integrinelor.

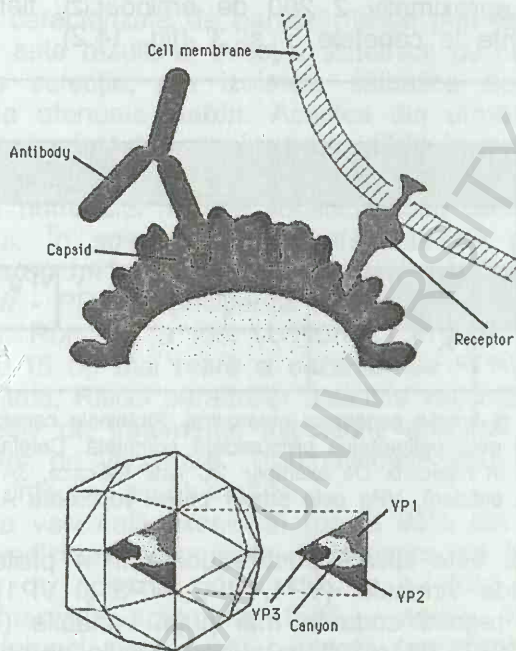


Fig. 14.1. Jos: Schema asamblării capsidei la poliovirusuri. Fiecare capsomer este alcătuit din mai multe polipeptide (VP1-VP3) care, asamblate, lasă liberă o porțiune adâncită numită canion. Sus: Pe fundul canionului este situl de legare al receptorului celular ICAM. Canionul este atât de îngust, încât nu permite porțiunii Fab a anticorpilor să acceadă la situl de legare. Aceasta înseamnă că în complexe imune virus-anticorpi virusul poate încă să cupleze receptorii celulari.

MORFOLOGIA ȘI REPLICAREA VIRIONULUI

Picornavirusurile au virionii sferici cu diametru mic (25-30 nm) și simetrie icosaedrică a capsidei care grupează 60 de capsomere. Acidul ribonucleic simplu spiralat cu polaritate pozitivă alcătuiește genomul. Acidul nucleic izolat de capsidă reține proprietățile infectante.

Rezistența picornavirusurilor la antiseptice, ca și la pH-ul acid gastric, la enzime proteolitice și săruri biliare este remarcabilă. Rhinovirusurile sunt însă labile la pH acid și termostabile. De notat

că termostabilitatea enterovirusurilor crește la concentrații molare de $MgCl_2$, substanță utilizată la preservarea vaccinului polio viu atenuat.

Stabilitatea poliovirusurilor în apele reziduale le face un bun indicator al poluării virale a mediului, după cum prezența lor în apa potabilă indică contaminarea fecaloid menajeră.

Genomul enterovirusurilor cuprinde o regiune codantă pentru o poliproteină de aproximativ 2 200 de aminoacizi, flancată de două regiuni noncodante la capetele 5' și 3' (fig. 14.2).

5'UTR										3'UTR	
ARN viral (7,5 kb)											
traducere											
VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	VPg	3Cpro	3Dpol	
VP0			PX								

Fig. 14.2. Structura și funcția genomului enteroviral. Proteinele capsidare (VP1 la VP4) sunt hașurate. VP0 este poliproteina precursoră completă. Celelalte proteine nehașurate sunt utilizate în replicare. De exemplu: 2C este helicaza, 3A este anco ra la membrana celulară, VPg este primer pentru replicarea ARN viral.

Poliproteina este clivată posttraducere în 4 proteine structurale situate pe capsida virionului (VP4, VP2, VP3 și VP1). Secvențierea parțială a unor regiuni codante mai puțin variabile (VP1, VP4 sau joncțiunea VP4-VP2) dă rezultate superpozabile serotipării. Regiunile mai puțin variabile sunt mai puțin expuse pe capsidă și nu sunt supuse acțiunii selective a răspunsului imun al gazdei.

Mecanismul uzual de inițiere a traducerii la eukariote implică legarea ribozomului de o structură 5' terminală. Traducerea începe la un codon de inițiere, într-un context apropiat, realizat, de obicei, de o secvență scurtă de recunoaștere care precedă codonul de inițiere. Regiunea 5' netradusă a genomului polio acționează ca un situs intern de intrare a ribozomului, de unde importanța sa critică în replicare.

CLINICĂ

Enterovirusurile se transmit pe cale fecal-orală și pot coloniza, adesea asimptomatic, tractul digestiv. Epidemiile hidrice cu enterovirusuri sunt fie urmarea consumului apei sau băuturilor contaminate, fie a scăldatului în ape nesupravegheate sanitar. În ultimul caz, afecțiunile nu sunt numai digestive, ci și dermatologice, oftalmologice, neurologice.

Deși enterovirusurile excelează prin frecvența infecțiilor asimptomatice, într-o proporție mică de cazuri (1/100) pot determina afecțiuni severe: meningite cu lichid clar, encefalite, morți subite ale noul-născutului.

Poliomielita infantilă

Afecțiune caracterizată de paralizii flasce prin leziuni de neuron motor periferic, este rezultatul infecției sistemice cu cele trei tipuri de poliovirus. Prin selecție, din izolatele sălbatice de polio au fost obținute tulpinile atenuate **Sabin**. Acestea din urmă sunt lipsite de neurotropism și au fost folosite încă din 1960 în producția vaccinului polio viu atenuat, administrat oral (**VPO**). Stabilitatea atenuării este relativă datorită numărului mic de substituții care determină pierderea neurotropismului. În special tulpinile atenuate de polio 3 pot da "**revertanți neurotropi**" care sunt cauza **poliomielitei paralitice asociate vaccinării** - PPAV - (incidență 1 la 1 milion de doze de vaccin administrat). România a fost confruntată în anii 1960-1985 cu o incidență de 10-15 ori mai mare a cazurilor de PPAV comparativ cu Europa occidentală. Riscul paraliziiilor asociate vaccinării a fost atribuit numărului excesiv de tratamente injectabile aplicate copiilor în perioada campaniilor de vaccinare. Traumatismele sau efortul muscular sporește riscul infecției simptomatice.

Acoperirea vaccinală excelentă (peste 95% din copii, vaccinați) a condus la eradicarea poliomielitei în America de Nord și de Sud. Ultimele cazuri de polio cu virus sălbatic au fost diagnosticate în România în intervalul noiembrie 1990 - aprilie 1992, în județul Constanța. De atunci, deși există o atentă supraveghere a **paraliziiilor flasce acute** (PAV), nu au mai fost izolate poliovirusuri sălbatice. Aceasta confirmă alinierea României între țările "**polio free**".

Statutul **polio free** poate fi menținut numai cu condiția imunizării continue a noilor generații de copii. O tulpină de polio 1 sălbatic a fost izolată în 1999 de la un copil în China, la granița cu Nepalul, după cinci ani de "**polio free status**". Aceasta demonstrează necesitatea continuării administrării vaccinului. Cazul pare a fi fost importat din India, deși tulpina prezintă numai asemănări depărtate cu tulpinile din Nordul Indiei (97,6% identitate în secvență). În general, se consideră înrudite tulpinile care nu prezintă diferențe mai mari de 1% în secvență.

Programul mondial de eradicare a poliomielitei a fost bulversat de epidemia din Nigeria cu virusul polio sălbatic de tip 1 și 3. În prima săptămână din 2004, în Nigeria au fost raportate peste 300 de cazuri și, cum era previzibil, cazuri noi au fost diagnosticate în țările vecine: Burkina Faso, Chad, Ghana și Togo. Pentru limitarea exportului epidemiei, aceste țări au inițiat campanii de revaccinare care au costat 20 milioane de dolari. Slaba motivare a vaccinatorilor,

lipsa campaniilor de promovare a vaccinului, ca și unele zvonuri privind slaba lui calitate au ridicat dubii asupra eficienței revaccinării. Acesta este cel mai bun exemplu al caracterului transnațional al eforturilor de prevenire a epidemiilor și ilustrează, din nefericire, cum eșecul unei țări riscă să se transforme în eșec continental.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Diagnosticul se face prin izolarea virusului pe culturi celulare, prin evidențierea genomului viral prin reacția de amplificare genică după reverstranscriere (RT PCR) sau serologic. Identificarea enterovirusurilor prin microseroneutralizare cu pooluri de seruri de referință este tehnica clasică de diagnostic (Melnick). Diagnosticul complet trebuie să stabilească tipul antigenic de poliovirus iar, în cadrul fiecărui subtip, fenotipul tulpinii izolate: sălbatică (neurotropă), atenuată (nonneurotrope) sau revertanți ai tulpinilor vaccinante. Diagnosticul între tipurile antigenice se face prin seroneutralizare; diagnosticul între tulpinile atenuate și cele sălbatice se face prin seroneutralizare cu anticorpi monoclonali sau prin diagnostic molecular (RT PCR).

Diagnosticul prin microseroneutralizare este înlocuit tot mai frecvent de diagnosticul molecular bazat pe secvențierea unor porțiuni din genomul viral. Noi metode de caracterizare a izolatelor recente de la bolnavii cu paralizii flasce sunt implementate în prezent:

- diagnosticul molecular pentru identificarea genomică (prin RT PCR și secvențiere) și
- caracterizarea antigenică pentru detecția diferențelor în raport cu tulpinile atenuate din VPO Sabin (prin ELISA sau cu ajutorul unui set de anticorpi monoclonali).

Izolatele genic relate cu tulpinile atenuate Sabin, dar diferite antigenic, sunt tulpini posibil VDPV. Secvențierea porțiunii genomice care codifică VP1 stabilește diferențele între tulpinile VDPV și cele sălbatice. Obținerea mai multor izolate asemănătoare legate geografic și temporal indică o epidemie cu cVDPV. Un pilon esențial al programului de eradicare a poliomielitei este confirmarea diagnosticului etiologic și clasificarea izolatelor.

Fenotipul atenuat

Selecția și clonarea tulpinilor atenuate de poliovirus realizate de Sabin reprezintă un pas important în înțelegerea determinismului genetic al proprietăților biologice ale virusurilor. Caracterele sau markerii folosiți pentru selecția in vitro (de exemplu: replicarea la temperatură supraoptimală, rezistența la inactivare termică, rezistența la

guanidină etc.) se suprapuneau cu neurovirulența în vivo, dar nu aveau același determinism genomic. Numai progresele recente au precizat baza moleculară a neurovirulenței.

Secvențierea genomului pentru toate tipurile de poliovirus, atât pentru tulpinile neurovirulente, cât și pentru cele atenuate, a condus la următoarele concluzii:

- atenuarea este rezultatul unui număr foarte mic de mutații: câte două pentru tipurile 2 și 3, mai multe pentru tipul 1;
- fiind determinată de mai multe mutații, atenuarea tipului 1 este foarte stabilă; tipul 3 atenuat produce în cursul replicării la om mulți revertanți neurotropi, odată cu pierderea fenotipului sensibil la temperatură supraoptimală 40°C;
- excreția tipului 1 la vaccinați durează numai câteva zile, în timp ce pentru tipurile 2 și 3 se prelungește peste 70 de zile, sporind riscul apariției revertanților;
- mutațiile esențiale pentru atenuare sunt situate câte una în regiunile 5', segmentul netradus, și în regiunea care codifică VP1;
- baza moleculară a atenuării este diferită la fiecare serotip;
- "corecția" mutațiilor din regiunea 5' netradusă este greu realizabilă, acest segment fiind esențial pentru replicare.

Determinismul molecular al antigenității poliovirusurilor

Ingineria genică oferă procedee tehnice pentru producția unor vaccinuri mai sigure, mai imunogene și la un preț de cost redus. O condiție prealabilă pentru o astfel de abordare a optimizării vaccinurilor este obținerea de informații detaliate asupra bazei moleculare a antigenității și neurovirulenței.

Utilizând anticorpi monoclonali, a fost identificat un epitop major implicat în neutralizarea poliovirusurilor situat pe polipeptidul capsidar VP1, alcătuit din numai 8 aminoacizi (pozițiile 93-100). Cum era de așteptat, între cele trei tipuri de poliovirus există deosebiri marcate între secvențele de aminoacizi din această regiune. În schimb, între tulpinile atenuate Sabin și cele neurovirulente de același tip, epitopul implicat în neutralizare este practic identic. Variantele antigenice rezultate în urma replicării poliovirusurilor în organismul uman apar cu o frecvență mare. Aparenta stabilitate antigenică a poliovirusurilor se datorește și participării celorlalte peptide capsidare în antigenitate. Nu putem reduce antigenitatea la un singur epitop. Structuri complexe, rezultate din asamblarea tuturor peptidelor capsidare, sunt responsabile de conservarea în timp a specificității antigenice.

PATOGENIA INFECȚIEI PARALITICE

Paralizia este o complicație rară (1 la 100 de cazuri) a unei infecții triviale, etichetată ca poliomielită abortivă, care se rezumă la

febră, greață, migrenă. Complicațiile motorii sunt precedate de dureri musculare, fasciculații, care în 2-3 zile se manifestă prin paralizii flasce cu extindere mare la debut. Poliomiелita bulbară este letală prin insuficiență cardiorespiratorie. În cazurile neletale paralizii inițiale se pot restrânge ca arie motorie pe seama resorbției infiltratului inflamator perineuronofagic și a supleerii funcționale de către grupele musculare complementare.

Patogenia infecției paralitice este bifazică. Multiplicarea primară a virusului are loc la nivelul porții de intrare în orofarinx sau în intestinul subțire (faza digestivă). Virusul diseminează pe cale sanguină (viremie primară) și poate să se cantoneze și să se replice în neuronii motori spinobulbari (faza neuromotorie → forme paralitice). Din fericire, în majoritatea cazurilor (99%) infecția se rezumă la faza digestivă (forme abortive). Probabilitatea afectării neurologice este influențată de factori locoregionali (traumatisme, oboseală musculară, injecții intramusculare) sau generali (vârstă, graviditate, imunosupresie). Urmează viremia secundară întreruptă de apariția efectorilor imunitari (anticorpi, celule T citotoxice). Tulpinile atenuate Sabin realizează numai infecții abortive, ele fiind lipsite de neurotropism.

Incubația în poliomiелită este de 1-2 săptămâni, iar imunitatea este monospecifică și permanentă. Cel mai răspândit serotip incriminat în formele paralitice este tipul 1 însă, consecutiv administrării în masă a vaccinului, tipul 3 a devenit predominant. Datorită frecvenței revertanților neurotropi la tulpina polio 3 atenuată, dar și a imunogenității slabe a acestui tip în vaccinul trivalent, formele paralitice etiologic determinate de tipul 3 sunt frecvent paralizii asociate vaccinării.

Pentru o imagine completă asupra răspunsului la vaccinarea antipoliomiелitică cu vaccin viu sau atenuat, trebuie spus că titrul anticorpilor specifici obținuți după fiecare doză administrată este mai rapid și mai înalt, consecutiv VPI, dar persistă mai mult după VPO. Vaccinul oral balansat conține 10^6 DIC₅₀ pentru tipul 1, 10^5 pentru tipul 2 și $10^{5.5}$ pentru tipul 3: vaccinul inactivat conține 40 de unități antigenice (D) pentru tipul 1 și câte 8 D și 32 D pentru tipurile 2, respectiv 3.

PROFILAXIE

Obținerea vaccinurilor poliomiелitice a fost posibilă datorită cultivării virusurilor pe culturi celulare. Suportul financiar al cercetărilor a fost asigurat din donații publice adunate în urma uneia din cele mai impresionante acțiuni de solidaritate umană. *National Foundation for Infantile Paralysis* din S.U.A. a organizat "*March of Dimes*" (*dimes* = monezi de zece cenți). În numai trei zile, spațiul Casei Albe s-a umplut de bănuți, colecta publică interferând buna funcționare a afacerilor statului.

Jonas Salk a reușit în 1953 prima testare la om a vaccinului inactivat (VPI). Primii voluntari au fost Salk însuși și proprii săi studenți. Vaccinul a fost eficient și lipsit de reacții adverse. În primii 5 ani de aplicare numărul anual al cazurilor de polio înregistrate în S.U.A. a scăzut de la 21 000 la numai 2-3 000. Un incident serios a marcat această activitate de pionierat. La unul din laboratoarele care producea vaccinul procesul de inactivare a fost incorect condus, vaccinul conținea virus neurotrop și vaccinarea a determinat peste 200 de cazuri paralizice la copiii imunizați. În ciuda acestei tragedii, două consecințe benefice pot fi retrospectiv semnalate: creșterea exigenței în ceea ce privește controlul calității tuturor vaccinurilor și promovarea cercetărilor vizând vaccinul polio viu atenuat (VPO). Albert Sabin este autorul acestuia din urmă. Tulpinile atenuate, nonneurotrope sunt imunogene pe cale orală, mimând infecția naturală. Probabil, cel mai important avantaj al acestui vaccin este imunizarea porții de intrare și inducția unei protecții eficiente pentru tot restul vieții.

Demonstrarea inocuității și eficienței celor două tipuri de vaccin poliomielitice a fost premisa campaniilor extinse de vaccinare care, în câteva țări, au eradicat boala. Vaccinul viu Sabin, administrat oral, are multiple avantaje principale. Conținând virus viu care se replică activ în mucoasa intestinală, stimulul imunogen al vaccinului este similar cu cel al infecției naturale subclinice. Astfel, vaccinul viu nu determină numai sinteza anticorpilor serici IgG, ci și a celor secretori, IgA, de la nivelul mucoasei intestinale. Ca urmare, este evitată invazia SNC în urma viremiei primare, dar și excluderea subiecților vaccinați din lanțul epidemiologic datorită imunizării porții de intrare. Mai mult, tulpinile atenuate din vaccin tind să înlocuiască tulpinile circulante sălbatice. În zilele noastre, când ne aflăm în pragul eradicării globale a poliomielitei, toate aceste avantaje pălesc. Posibilitatea circulației interumane a tulpinilor vaccinante și apariția revertanților neurotropi constituie obstacole pentru succesul campaniei de eradicare.

În plus, câteva impedimente grevează utilizarea exclusivă a vaccinului viu:

- interferența între serotipurile 1-3 din vaccin și interferența tulpinilor vaccinate de alte enterovirusuri care populează tractul digestiv;
- dependența eficienței vaccinului de asigurarea lanțului de frig în stocaj și transport;
- instabilitatea genetică, în special, a tulpinii atenuate polio 3 Leon, care generează revertanți neurotropi;
- pericolul contaminării vaccinului cu virusuri cu potențial patogen din substrat.

Alternative pentru amendarea acestor probleme sunt în studiu și, nu în ultimul rând, se experimentează scheme complexe care folosesc atât vaccinul inactivat, cât și cel oral.

Încă din 1977, Organizația Mondială a Sănătății (OMS), reconsiderând succesul vaccinării antivariolice, a inițiat programul lărgit de vaccinări (EPI), care își propunea imunizarea tuturor copiilor împotriva a șase boli contagioase: TBC, difterie, tuse convulsivă, tetanos, polio și rujeolă. Când EPI a fost inițiat, numai 5% din copiii globului primeau aceste vaccinuri, iar în 1990 cifra a ajuns la 80%. La acest nivel de acoperire vaccinală, EPI a calculat că peste 2,2 milioane de decese la copii puteau fi evitate și, în plus, 355 000 de cazuri de poliomielită. Succese importante au fost înregistrate în cele două Americi, unde ultimele 2 cazuri de polio datorate infecției cu virus sălbatic au fost înregistrate în 1991 (în Columbia și Peru). În România și în toate țările vecine unde se aplică VPO continuă să fie diagnosticate rarisim cazuri în rândul minorităților nevaccinate. Apariția cazurilor polio nu este apanajul țărilor în curs de dezvoltare. În 1992, Olanda a fost locul unui astfel de focar. Poliomielita endemică persistă în Balcani, în Turcia și în unele republici din fosta U.R.S.S. Războaiele, agitația socială, tranziția par să fie obstacole neașteptate în eradicarea polio.

INIȚIATIVA DE ERADICARE GLOBALĂ A POLIOMIELITEI

În 1988, OMS a decis eradicarea globală a paraliziei infantile (PEI = *Global Polio Eradication Initiative*). Urmare a eforturilor mai multor organizații internaționale, numărul cazurilor polio raportate a scăzut de la 350 000 în 1988, la <2000 în 2005. La începutul lui 2006 rămâneau patru rezervoare de virus poliomieltic: Afganistan, India, Pakistan și Nigeria. Ultima țară care înainte de 2000 realizase mari progrese în controlul diseminării poliomielitei (întreruperea transmisiei în cel mai mare megacity african: Lagos - 12 milioane de locuitori) cunoaște în 2003-2004 o recrudescență importantă datorată întreruperii vaccinării în regiunile din nordul țării. Anumite învățăminte pot rezulta din eșecul nigerian. În primul rând, urmările catastrofale ale interferenței politicului în programele sanitare și folosirea nerealizărilor ca armă electorală. În al doilea rând, lipsa de educație, care a facilitat răspândirea celor mai rău intenționate zvonuri: vaccinul este contaminat cu HIV (!) sau vaccinul are efect sterilizant (!!). În fine, slaba calitate a serviciilor publice de sănătate și pregătirea precară a personalului au compromis atât eforturile naționale, cât și contribuțiile (din ce în ce mai limitate) ale sponsorilor externi.

Două obstacole noi sunt recunoscute a împiedica eradicarea poliomielitei:

- epidemiile asociate cu tulpini derivate din vaccinul atenuat (VDPV = *vaccine-derived polioviruses*),

- excreția îndelugată a tulpinilor vaccinale administrate impropriu copiilor cu imunodeficiențe.

Atât timp cât va continua utilizarea VPO, eradicarea poliomielitei nu va fi posibilă. Supravegherea virusologică în țările care folosesc încă VPO (între care și România) a relevat noi proprietăți biologice ale tulpinilor atenuate:

- capacitatea de transmitere interumană și de producție de recombinanți, care conțin secvențe ale unor proteine nonstructurale ale altor enterovirusuri;

- capacitatea de a suferi mutații antigenice în raport cu tulpinile Sabin (la tulpinile VDPV);

- apariția mutațiilor antigenice (situate mai ales în VP1) la tulpinile care circulă interuman în colectivitățile slab imunizate.

Izolatele recente de poliovirusuri se împart în trei categorii, identificate după gradul de divergență în secvența genomică în raport cu tulpinile Sabin:

- tulpini VDPV asemănătoare tulpinilor Sabin (<1% divergență),

- tulpini VDPV argumentat derivate din tulpinile Sabin (1-15% divergență),

- tulpini sălbatice posibil revertanți neurovirulenți (>15% divergență).

Cea de-a doua categorie se subîmparte în tulpini **iVDPV** - izolate de la imunodeficienții vaccinați; tulpini **cVDPV** - izolate în comunitățile cu acoperire vaccinală precară și tulpini **aVDPV** - cu sursa neidentificată.

- **iVDPV** se excretă peste 6-12 luni (normal sub 6-8 săptămâni), iar infecția copiilor cu imunodeficiențe congenitale sau a celor cu SIDA cu aceste tulpini (frecvent, tipul 2) poate fi fatală.

- **cVDPV** au produs epidemii în țările cu acoperire vaccinală slabă (Madagascar, Indonezia).

- **aVDPV** au fost izolate de rețeaua laboratoarelor polio mai ales în momentul tranziției de la aplicarea VPO la imunizarea obligatorie cu VPI.

Astfel de cazuri s-au semnalat în Belarus, Rusia, România. În 2002, o tulpină aVDPV tip 1 a fost izolată în România de la un bolnav cu paralizie flască și de la 7 contacti.

Comisia Națională de Experți desemnată de OMS/EURO la propunerea Ministerului Sănătății pentru a monitoriza și a certifica acțiunile întreprinse în România în vederea eradicării poliomielitei a identificat următoarele obstacole care întârzie confirmarea acestui obiectiv: nu se cunoaște gradul real de acoperire prin vaccinare a copiilor, există grupuri relativ compacte de copii nevaccinați (în special romi), ce pot constitui un pericol major de implantare/reimplantare a unor agenți patogeni, nivelul social-educativ precar, deficiențe mari în igiena comunitară și în calitatea apei potabile. Înlocuirea imunizării antipolio

exclusiv cu VPO prin introducerea imunizării exclusiv cu VPI sau aplicarea temporară a unei scheme mixte VPI urmat de VPO este o urgență a sănătății publice în România.

Boli determinate de alte enterovirusuri

Virusurile Coxsackie, ECHO și celelalte enterovirusuri neclasificate au fost puse în evidență în cursul supravegherii epidemiologice a poliomielitei, practic de la subiecți sănătoși, fără simptomatologie manifestă.

Totuși, virusurile Coxsackie produc uneori afecțiuni care vizează SNC, inima, musculatura scheletică, pielea etc. Câteva exemple caracteristice sunt: pentru virusurile Coxsackie A: herpangină, diarei minore de vară, meningite aseptice; pentru Coxsackie B: mialgie epidemică sau pleurodinia Bornholm, moarte subită a nou-născutului, meningite aseptice, miocardite, pancreatite, hepatite; pentru virusurile ECHO: meningite aseptice, guturai, conjunctivite, exanteme.

Virusurile Cox sunt patogene pentru șoarecele nou-născut (spre deosebire de ECHO și polio). Cele din grupul A produc miozite difuze și pareze flasce, cele din grupul B produc miozite focale și pareze spastice la șoarecele nou-născut (criteriu de diagnostic).

Virusurile ECHO produc uneori epidemii extinse de meningite aseptice. Astfel, în vara anului 1999 o epidemie (cu virusul ECHO 33, Cernescu și colab., 2000) de peste 5 000 de cazuri a afectat județele din Moldova, extinzându-se ulterior și în restul țării. Cazurile s-au datorat consumului apei infectate sau scăldatului în ape contaminate și au prevalat la grupa de vârstă 5-15 ani.

Impactul economic al meningitelor virale (meningite aseptice sau cu lichid cefalorahidian clar) este considerabil, fiind estimat la cheltuieli în jur de 5 000 \$ per caz (costuri directe) și cel puțin 8 zile de inactivitate (costuri indirecte). În 90% din cazuri, aceste meningite sunt de etiologie enterovirală. Cheltuielile directe sunt mai mari pentru cazurile pediatrice și derivă din administrarea empirică a antibioticelor și îngrijirea cazurilor cu deshidratare severă în serviciile de reanimare.

Diagnosticul infecțiilor enterovirale se pune prin:

- izolarea virusului din materii fecale (rar din LCR, în formele neurotrope),
- amplificarea genomică din probele LCR sau ser;
- evidențierea anticorpilor virus-neutralizanți de faza acută (IgM).

Boli determinate de rhinovirusuri

Peste 100 de serotipuri rhinovirale au fost implicate în etiologia guturaiului, afecțiune banală, dar semnificativă prin contagiozitatea și

disconfortul produs. Incubația scurtă (2-4 zile) și rezoluția rapidă (până la 7 zile) traduc epuizarea conflictului virus - organism gazdă numai la nivelul epiteliului ciliat respirator nazal (poarta de intrare). Rhinovirusurile cultivă numai pe țesuturi sau culturi celulare de origine umană și, mai bine, la 33°C. Unele tulpini au fost adaptate la celule simiene. Un sistem gazdă mai avantajos îl reprezintă culturile de organ (epiteliu traheal uman). Imunitatea este specifică de tip, însă pasageră (pierzându-se la 2-3 luni de la infecție). IgA de tip secretor au un rol determinant în rezistența imediată.

Descoperirea că acidul nucleic al picornavirusurilor este infectant pentru un număr mai mare de specii celulare decât virionul asamblat a sugerat corelarea susceptibilității celulare cu prezența unor receptori care leagă specific determinanții prezenți la nivelul capsidei virale.

Acești determinanți au putut fi precizați, prin analiza unui rhinovirus, ca fiind situați pe fundul unor depresiuni ale capsidei. Receptorii celulari sunt proiecții subțiri care pot avea acces în depresiunile înguste ale capsidei (canioane). Anticorpii antivirali au porțiunea Fab de două ori mai mare decât diametrul canionului și nu pot afecta determinanții care leagă receptorii celulari. S-a preconizat un atractiv model evolutiv al picornavirusurilor care s-ar fi dezvoltat sub acțiunea selectivă a prezenței anticorpilor. Virusurile își protejează determinanții legați de receptorii celulari, în raport cu acțiunea neutralizantă a anticorpilor, mascându-i în relieful inaccessibile ultimilor.

Concluzii

Acronimul picorna poate fi atribuit unei formule mnemotehnice utile pentru precizarea unor proprietăți generale ale acestui grup: p-poliovirus; i-insensibilitate la eter; c-Coxsackie; o-orphan; r-rhinovirus, RNA-acid ribonucleic. În același timp, prefixul pico denotă talia mică a virusurilor.

Importanța medicală a acestor agenți patogeni a justificat studii intense care au condus, pe de o parte, la descoperiri practice deosebite - vaccinurile antipolio și, pe de altă parte, la descoperiri fundamentale în biologia moleculară.

Sinteză

Enterovirusuri

Morfologia virionului: talie: 27 nm, sferic, neanvelopat, capsidă icosaedrică cu 60 de capsomere. Componente structurale: fiecare capsomer conține patru proteine virale: VP0 (precursor polipeptidic) și peptidele clivate VP1; VP2; VP3.

Genom: ARNss, linear, nesegmentat, polaritate pozitivă; 4 cadre de citire. Organizarea genomului: genomul complet are ~7 400 de nucleotide care constituie matrița pentru traducerea unei poliproteine

precursor (VP0), din care rezultă prin clivaje secundare proteinele capsomerelor: VP2; VP3; VP1 (în ordinea traducerii 5' → 3'). VP4 nu a fost detectat în virionul matur. La capetele 5' → 3' se află segmente netraduse poliadenilate (UTR).

Tropism: major - epiteliul intestinal; secundar - neuronul motor.

Culturi susceptibile: simiene (*african green monkey kidney*, BSC-1); diploide umane, rhabdomiosarcom uman, ECP: citolitic.

Boli asociate: poliomielite. Miocardita, pancreatita, meningita aseptică cu Cox B1-B6. Moartea subită a nou-născutului - Cox? Conjunctivita hemoragică cu Entero 70. Herpangina cu Cox A1-6. Afte pe mucoasa orală: Cox A4, A9, A10, A16.

BIBLIOGRAFIE

Landsteiner K, Popper E. Etiologia virală a poliomielitei. *Immunitatfosch. Orig.* 1910;2:377-390.

Landsteiner K, Levaditi C. Izolarea virusului la maimuță, 1911.

Melnick JL et al. Izolarea primului enterovirus nonpoliomielitc (Coxsackie B2). *J. Exp. Med.* 1947; 1950;91:185-195.

Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivarea poliovirusurilor în culturi de celule (premiul Nobel). *Science* 1949;109:85-87.

Salk JE et al. Vaccinul polio inactivat. *Am. J. Publ. Hlth.* 1954; 44:563.

Sabin AB. Vaccinul polio viu atenuat. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1955;61:924-938.

GASTROENTERITE VIRALE

De reținut:

Virusurile nu constituie o floră "normală" a tractului intestinal. Ele sunt totdeauna invazive și determină leziuni ale mucoasei. Cu toate acestea, formele clinice inaparente predomină. În etiologia diareilor virale au fost identificați mai mulți agenți: rotavirusuri (endemic, mai ales la copii), calicivirusuri (epidemic, la orice vârstă), enterovirusuri, adenovirusuri, astrovirusuri, coronavirusuri etc.

Boala diareică acută

Boala diareică acută (BDA) rămâne una din cele mai frecvente cauze de morbiditate și mortalitate la copiii sub 5 ani. Această afirmație este caracteristică țărilor în curs de dezvoltare cu structuri igienico-sanitare precare, dar epidemii de BDA se întâlnesc și în țările dezvoltate. Principalii factori care contribuie la incidența BDA sunt calitatea nesatisfăcătoare a apei potabile, educația necorespunzătoare a copiilor în familie și colectivități, lipsa resurselor economice etc. Cauzele infecțioase ale BDA includ o varietate de patogeni bacterieni, virali, parazitari. Gastroenteritele (GE) virale sunt frecvent provocate de rotavirusuri, calicivirusuri, adenovirusuri. GE virale sunt adesea concomitente cu infecții bacteriene cu *Escherichia coli* enterotoxigenă, *Salmonella*, *Shigella* sau chiar cu vibrionul holerici. Rotavirusurile sunt responsabile de aproape jumătate din BDA la om. Organizația Mondială a Sănătății estimează că BDA este responsabilă de 17% din cele 10,6 milioane decese înregistrate anual la copii sub 5 ani. Dintre acestea, 40% (700 000) sunt datorate gastroenteritei rotavirale. Este evidentă oportunitatea unui vaccin care să prevină aceste pierderi.

GE sunt mai frecvente în familiile cu copii mici și cu spațiu restrâns de locuit, unde transmiterea se face cel mai adesea prin contact. Alimentele contaminate ca sursă de infecție sunt incriminate în izbucnirile epidemice. Rotavirusurile sunt responsabile de peste 50% GE virale la copii sub 2 ani (tabelul 15.I). La adulți, astro- și calicivirusurile sunt mai frecvent incriminate. Probabilitatea contaminării

depinde de consistența măsurilor de igienă personală (spălatul frecvent pe mâini, în primul rând). Imunitatea are un rol limitat în protecție și este datorată anticorpilor secretori (IgA) de la nivelul mucoasei intestinale. Un inocul minim, sub 100 de particule infectante, este suficient pentru a declanșa boala. În mod ironic, mesele festive, unele prilejuite de congrese de virusologie, s-au soldat cu epidemii rotavirale.

TABELUL 15.1

GASTROENTERITE VIRALE

Cele mai frecvente cauze ale gastroenteritelor virale*
Rotavirusuri (la sugari și copii mici)
Calicivirusuri (Norwalk-like) - genul Norovirus
Adenovirusuri 40 și 41
Astrovirusuri

***Bacterii** în etiologia gastroenteritelor: *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium difficile*; **parazitoze**: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*.

ROTAVIRUSURI

CLASIFICARE

Rotavirusurile sunt cauza cea mai frecventă a gastroenteritelor virale, mai ales la copiii preșcolari (peste 50% din cazurile spitalizate).

Genul rotavirus, împreună cu genurile reovirus și orbivirus, compune familia reoviridae (alte 3 genuri infectează insectele). Sunt virusuri sferice (70 nm în diametru), neanvelopate, dar cu o capsidă icosaedrică în două straturi. Genomul este ARNds, segmentat (11 segmente la rotavirusuri), cu replicare exclusiv citoplasmatică. Rotavirusurile izolate de la om se încadrează în mai multe serotipuri (tipul 2 este cel mai patogen); serotipuri înrudite determină diaree la viței și porci (fig. 15.1).

Capsida dublă este alcătuită din capsomere cu proprietăți enzimice. Existența a 11 segmente ARNds viral permite împărțirea rotavirusurilor în mai multe grupuri și *electroforetipuri*. Patogenii umani sunt clasificați în grupul A, însă omul poate fi infectat și de rotavirusuri de la porci sau viței.

Virusurile sunt foarte rezistente la temperatură și dezinfectante și cultivă greu pe culturi celulare.

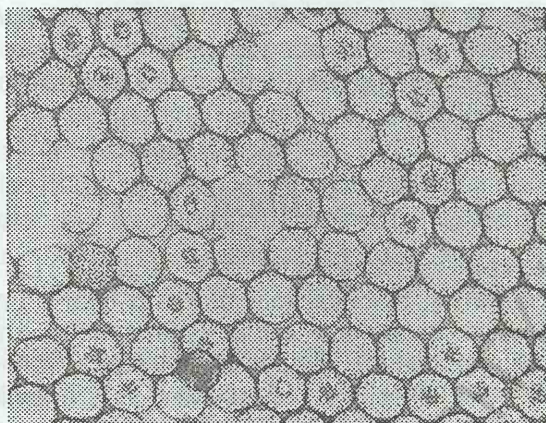


Fig. 15.1. Morfologia virionului rotaviral la microscopul electronic (preparat concentrat). Virion icosaedric cu trei învelișuri. Trei pături suprapuse: la suprafață: VP2 (S - trama de susținere), VP6 intermediară (E) și intern NC. 132 canale penetrând cele trei pături (M). Genom ADNds linear cu 11 segmente.

PROPRIETĂȚI REPLICATIVE

Cultivarea in vitro a agenților diareilor virale este dificilă, iar rotavirusurile nu fac excepție. Tropismul lor limitat la celulele epiteliale ciliate ale tractului intestinal explică dificultatea izolării. In vivo, celulele infectate sunt situate spre vârful vilozităților intestinale din segmentul mediu și terminal al intestinului subțire. Infecția este urmată de apariția incluziilor citoplasmice și exfolierea celulelor parazitare care sunt înlocuite cu celule plate, scuamoase, cu villi scurtați.

În acest habitat natural, rotavirusurile se replică abundent, ceea ce facilitează evidențierea lor prin imunoelectronomicroscopie sau alte metode. Replicarea virală este accentuată în cazul dublei infecții cu rotavirusuri și *Escherichia coli* enteropatogenă, combinație foarte frecventă în practică.

Celulele afectate morfologic sau funcțional de replicarea virală nu mai produc enzimele necesare digestiei intestinale. Persistența carbohidraților nedigerati în lumen este cauza esențială a diareei. Rehidratarea per os cu soluții saline și glucoză/zaharoză este o măsură terapeutică indispensabilă la copiii mici.

O problemă legată de patogenia infecției rotavirale la copii este eventuala participare a tractului respirator în diseminarea infecției. Dacă majoritatea afecțiunilor enterovirale (polio, Cocksackie etc.) sunt limitate de creșterea nivelului igienei comunitare, rotavirusurile continuă să prevaleze, chiar în instituții sanitare unde măsurile de igienă sunt strict respectate. Această diseminare sugerează și transmitia

aerogenă a virusului, pentru că infecția respiratorie este mai greu de influențat de măsuri care vizează mai ales transmitia alimentară. În plus, simptomatologia respiratorie (tuse, coriză) este frecventă în multe cazuri.

CLINICĂ

Gastroenteritele rotvirale sunt rare la adulți. La copii, evoluția este diferită la sugari și la copiii mai mari - 1-5 ani. La sugari, infecțiile pot debuta chiar în a doua zi de viață datorită prezenței virusului în unitățile de puericultură. Prezența anticorpilor IgA intestinali este condiția rezistenței la infecții și aceștia nu se transmit pasiv, de la mamă. Totuși, la sugarii alimentați la sân infecțiile simptomatice sunt rare sau au o evoluție subclinică. În general, la sugari simptomatologia este blândă.

La copii de 1-5 ani, debutul brusc, cu vomă, febră și diaree este caracteristic. Incubația este de numai 1-3 zile, iar durata evoluției (în cazurile necomplicate bacterian) de o săptămână. Aspectul scaunului diareic este caracteristic: cu mucozități, albicios, putrid. Vindecarea este grăbită de rehidratarea cu soluții saline și zaharoză. Deshidratarea necorectată la timp poate fi fatală.

Nu sunt rare episoadele repetate de infecții rotvirale la același copil datorită serotipurilor diferite. Adulții, deși frecvent asimptomatici, au un rol bine stabilit în reinfecția copiilor. Familia este o unitate cu rol semnificativ în diseminarea infecției.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Peste o treime din episoadele diareice acute la om sunt de etiologie rotvirală, ceea ce argumentează importanța practică a diagnosticului. Imunoelectronomicroscopia sau simpla examinare la microscopul electronic a preparatelor obținute prin centrifugări repetate ale fecalelor permite vizualizarea virionilor caracteristici, în formă de roată cu spițe și uniformi în dimensiuni (70 nm). Un alt examen important este electroforeza ARN viral, care separă cele 11 segmente genomice în profiluri distincte în raport cu arealul de răspândire al tulpinilor virale. Heterogenitatea în mobilitatea electroforetică a segmentelor este atribuită reasortării genomice și constituie un indicator pentru rezolvarea filiației cazurilor în ceea ce numim azi epidemiologie moleculară. Studiile electroforetice (serotipuri electroforetice) au indicat predominanța unei singure tulpini în arealuri limitate. Teste ELISA și de latexaglutinare pentru detecția antigenului capsidar comun de grup în fecale au devenit disponibile comercial.

Înrudirea între rotavirusuri a fost investigată și prin studii de hibridare moleculară, utilizând drept sonde secvențe polinucleotidice corespunzătoare polipeptidelor capsidei externe. Trei polipeptide au funcții importante și servesc pentru caracterizarea tulpinilor: VP4 și VP7, cu epitopi implicați în seroneutralizare, și VP6 - un antigen comun de grup. VP4 este diferit la tulpinile virulente de cele avirulente, asimptomatice. Ultimele par să constituie tulpini candidate pentru includerea într-un eventual vaccin administrabil per os.

Câteva obstacole specifice rotavirusurilor au amânat introducerea vaccinării:

- diversitatea tulpinilor circulante;
- producerea de reasortanți (prin schimburi între segmentele genomice);
- posibilitatea infecției umane cu rotavirusuri de la animale.

În privința diversității tulpinilor circulante, trebuie spus că pe capsida externă sunt prezente două proteine antigenice care induc anticorpi neutralizanți cu rol în protecție. Aceste proteine sunt: proteina G (de la glicoproteină) sau VP7 și proteina P (de la proteazo-sensibilă) sau VP4. Grupul A de rotavirusuri cuprinde 14 serotipuri, grupul G și mai multe, dar mai răspândite la om sunt G1-4. Serotipurile sunt diagnosticate prin seroneutralizare, iar genotipurile prin metode moleculare. După 1995, un alt serotip rotaviral a devenit preponderent - G9.

Două tipuri de vaccin rotaviral și-au probat eficiența și lipsa reacțiilor adverse: Rotarix® (GlaxoSmithKlein, Belgia) și RotaTeq® (Merck, S.U.A.). Rotarix® este monovalent pentru serotipul G1, iar RotaTeq® este pentavalent pentru serotipurile G1-G4 și *reasortanți bovin-uman*. Vaccinul se administrează per os, pentru că imunizarea tractului digestiv este esențială în protecție. Încercările mai vechi de vaccinare antirotavirală au determinat reacții adverse de tipul ocluziei intestinale la copiii sub 2 ani. Noile vaccinuri sunt sigure și eficiente.

Prevenirea infecțiilor la nou-născut se face prin respectarea regulilor de igienă și promovarea alimentației la sân. Infecțiile sunt sezoniere (pot apărea și iarna), mai ales în maternități și creșe.

Concluzii

Diareele rotvirale afectează frecvent copii sub 5 ani, și mai ales, copii bolnavi sau imunosupresați. Deshidratarea survine mai frecvent în diareele rotvirale decât în cele datorate altor enteropato-genii virali. Două tipuri de vaccin rotaviral administrabile per os sunt disponibile comercial: Rotarix®, monovalent, și RotaTeq®, pentavalent.

CALICIVIRIDAE

Dintre calicivirusuri, genul norovirus (ARNss, polaritate pozitivă), având ca prototip virusul "Norwalk" este cauza unor epidemii hidrice, explozive, de BDA asociate de crampe și vomă. Norovirusurile recunosc drept receptor antigenele sanguine de grup A/B sau antigenele Lewis. Norovirusurile au un spectru larg de specii gazdă, iar adaptarea la recunoașterea antigenelor de grup sanguin a jucat un rol important în patogenitatea pentru om.

Aproape 80% din persoanele peste 20 de ani au anticorpi împotriva unuia din virusurile care provoacă BDA. De aceea, prezența anticorpilor nu este semnificativă pentru diagnosticul formelor recente. Norovirusurile sunt cauza cea mai frecventă a focarelor epidemice de BDA. În absența diagnosticului molecular, următoarele criterii clinice sunt indicii de orientare: vomă în peste 50% cazuri, incubatie sub 24 de ore, durata bolii până la 60 de ore și lipsa izolării unei bacterii enteropatogene. Raportul febră/vomă și diaree/vomă este 1,5 în BDA virale și peste 3 în BDA bacteriene.

CLASIFICARE

Calix este cuvântul latin pentru cupă și desemnează aspectul particular al virionilor care, în microscopia electronică cu colorație negativă, iau frecvent înfățișarea cupei de lalea. Acesta nu este singurul element care diferențiază calicivirusurile de picornavirusuri. Sunt virusuri ARNss, cu simetrie icosaedrică, neanvelopate, 30-40 nm în diametru. Spre deosebire de calicivirusurile umane - noncultivabile - cele izolate de la pisică, câine sunt citopatogene în culturi de celule.

Agentul Norwalk. În 1969 în Norwalk, Ohio, S.U.A., jumătate din populație a fost afectată de o epidemie explozivă de gastroenterită cu debut brusc și durată autolimitată de 24-48 de ore. Ea a implicat copiii de vârstă școlară și contactii lor familiari sau ocazionali, indiferent de vârstă. În 1972, prin imunoelectronmicroscopie s-a demonstrat că agentul etiologic al acestor izbucniri epidemice de diaree acută este un virus ARNss, cu diametrul particulelor de >30 nm și cu o singură proteină structurală cu greutate moleculară de 59 kd. Aceste caracteristici au încadrat agentul Norwalk în grupul caliciviridelor, din care face parte și virusul hepatitei E.

EPIDEMIOLOGIE ȘI BOALA CLINICĂ

Calea de transmisie este fecal orală și infecția apare în tot cursul anului, la orice grupă de vârstă. Bolnavii sunt contagioși timp de 48-

72 de ore, sugerând o posibilă aerosolizare a virusului din mediul contaminat cu fecale. Clinic, agentul Norwalk determină întârzierea timpului de golire gastrică; cu greață, vărsături, crampe abdominale, febră și diaree. Boala este autolimitantă și dispare în cel mult 2 zile (tabelul 15.II).

TABELUL 15.II

DIFERENȚE CLINICE ÎNTRE GASTROENTERITELE VIRALE

Caracteristica	GE cu calicivirusuri	GE cu rotavirusuri
Epidemiologie	epidemii hidrice	forme sporadice
Incubație (zile)	1	2-3
Durata bolii (zile)	1-2	5-8
Evoluție	benignă	severă
Vârsta țintă	adolescenți	nou-născuți
Rata de atac %	50	10
Imunitate	locală și sistemică	locală

Una din cele mai curioase caracteristici ale infecției cu agentul Norwalk este răspunsul imun. Studii făcute pe voluntari inoculați cu virus au demonstrat că indivizii care dezvoltă titru semnificativ de anticorpi sunt cei care fac boala clinică și sunt susceptibili la o nouă infecție. Indivizii care, deși inoculați, nu dezvoltă simptomatologia caracteristică, nu au titru de anticorpi demonstrabil și nu sunt susceptibili la inocule repetate. Se presupune intervenția unor factori genetici în susceptibilitatea la aceste virusuri.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Imunoelectronomicroscopia pe preparate din materiile fecale rămâne cea mai bună metodă de detecție a virusului. Dacă sunt disponibile seruri cu titruri mari de anticorpi se pot face teste ELISA care detectează atât antigenele particulate, cât și pe cele solubile.

ALȚI AGENȚI ETIOLOGICI AI GASTROENTERITELOR VIRALE

Coronaviridae

Sunt virusuri cu genom ARNss, anvelopate, pleomorfe, cu proiecții de suprafață în formă de coroană solară. Au fost la început asociate cu boli respiratorii atât la adulți, unde afectau tractul respirator superior, cât și la copii, unde dădeau bronșiolite sau agravau simptomatologia astmului bronșic. La sfârșitul iernii - începutul

primăverii au loc izbucniri sporadice de infecții cu coronavirusuri. Semnificația lor practică a crescut după 2003, odată cu pandemia SARS CoV. Implicarea în etiologia gastroenteritelor umane a fost demonstrată prin studii epidemiologice și prin imuno-electronmicroscopie. De asemenea, unii agenți izolați de la om determinau simptomatologie enterică la animal. Coronavirusurile par a fi responsabile pentru BDA, care survine la copiii mari și adulții tineri, infecția sub 2 ani fiind neobișnuită. O altă deosebire față de rotavirusuri și calicivirusuri este perioada lungă de excreție a virusului de 1 an - 1 an și jumătate. Purtătorii asimptomatici sau foștii bolnavi sunt un rezervor important de virus. Izolarea este dificilă, coronavirusurile cresc cel mai bine în culturi de organ și sunt labile la condițiile necesare purificării. Proiecțiile de suprafață au proprietăți hemaglutinante și de fixare a complementului.

Adenovirusuri enterice

Serotipurile 38, 40, 41 ale adenovirusurilor sunt cele implicate în unele izbucniri epidemice de diaree acută la copiii sub 1 an. Debutul bolii este respirator, cu febră, rinoree, după care apare diaree manifestă. Uneori, boala se asociază cu pneumonie sau conjunctivită, ușurând diagnosticul de adenoviroză. Virusul este izolat din fecale timp de 4-14 zile.

Sunt adenovirusuri fastidioase, creșterea lor în culturi de embrion uman necesitănd o linie ce conține o parte a genomului adenovirusului tip 5. Studiile epidemiologice au demonstrat că adenovirusurile enterice sunt responsabile de 60% din cazurile de gastroenterită în sezoanele în care acestea nu pot fi atribuite rotavirusurilor. Aproximativ jumătate din copiii de 1 an au anticorpi împotriva adenovirusurilor enterice.

Astrovirusuri

Sunt particule de 28 nm diametru, cu formă de stea. Au fost izolate din scaunele nou-născuților cu gastroenterite, dar și ale celor sănătoși. Studiile pe voluntari au arătat transmiterea scăzută a bolii, dar cu creșteri semnificative în titrul anticorpilor.

Concluzii

Supravegherea bolilor diareice acute este o constantă a programelor de sănătate publică. Etiologia virală este incriminată în majoritatea cazurilor. Măsurile sugerate pentru profilaxie și control țin de particularitățile etiologice. Rotavirusurile sunt unicul grup pentru care există vaccin. Dificultățile de cultivare ale celorlalte virusuri implicate exclude deocamdată vaccinarea ca mijloc profilactic. Măsuri de igienă a apei, alimentelor și mediului sunt benefice pentru control. Tratamentul gastroenteritelor virale necesită măsuri de hidratare numai în cazurile care evoluează sever.

Sinteză

Rotavirusuri

Virion icosaedric cu trei învelișuri. Trei pături suprapuse la suprafață: VP2 (trama de susținere), VP6 intermediară și extern VP4 și VP7. 132 canale penetrând cele trei pături

Genom: ADNds linear cu 11 segmente.

Boala asociată: gastroenterite: diaree, vomă, deshidratare, incubatie <48 de ore.

Caliciviridae: Norovirusuri - virusurile Norwalk-like, Sapporo-like.

Virion mic (<30 nm), sferic, simetrie icosaedrică a capsidei, neanvelopat.

Genom: ARNss linear, sens pozitiv, aproximativ 7,5 kb, două cadre de citire.

Boli asociate: gastroenterite nebacteriene, similar cu cele produse de astrovirusuri. Îmbolnăviri asemănătoare la animale: bovine, porcine

Astroviridae

Astrovirusurile umane au structură sferică. Virionii sunt foarte mici, neanvelopați, cu diametrul de 28-30 nm. Caracteristice sunt 5-6 "colțuri" în formă de stea David la periferia virionului (în electronmicroscopie).

Genom: ARNss linear, sens pozitiv, alcătuit dintr-un unic segment și 3 cadre de citire.

Boli asociate: gastroenterite (la copilul mic, cu vomă și deshidratare), hepatite cu necroză focală sau/și imunosupresie la păsări (rațe, curcani), dar și la mamifere domestice.

BIBLIOGRAFIE

- Appleton H, Higgins PG. Prima izolare a unui astrovirus în afecțiuni diareice la copil. Lancet 1975; i:1297.
- Geigenmuller U et al. Construcția unui cADN infecțios pentru un astrovirus uman. J. Virol. 1997;71:1713-1717.
- Adler JL, Zickl RJ. Prima descriere a gastroenteritei de etiologie Norwalk. Inf. Dis. 1969;119:668-673.
- Kapikian AZ et al. Vizualizarea virusului prin microscopie electronică. J. Virol. 1972;10:1075-1081.
- Lambden PR et al. Descrierea secvenței întregului genom. Science 1993;259:516-519.
- Gomatos PJ, Tamm I. Descrierea naturii segmentate a genomului la reovirusuri. PNAS 1963;49:707-714.
- Flewett TH et al. Izolarea unui rotavirus din scaunul unor copii. Lancet 1973;2:1497.
- Spriggs DR, Fields BN. Identificarea proteinei care cuplează receptorul reoviral ca determinant al neurovirulenței. Nature 1982;297:68-70.
- Vesikari T et al. Primul vaccin rotaviral. Lancet 1984;1:977-981.
- Coffee MC et al. Reovirus folosit în viroterapie. Science 1998;282:1332-1334.

CORONAVIRIDAE

De reținut:

Sindromul acut respirator sever (SARS), prima pandemie a secolului XXI, constituie un exemplu încurajator pentru voința politică și posibilitățile tehnice de limitare a unei epidemii cu potențial sever. Deși s-au înregistrat global peste 8 000 de cazuri, cu o mortalitate în jur de 15%, a fost remarcabilă promptitudinea cu care s-a identificat un agent etiologic nou, coronavirusul SARS CoV, și cu care au fost produse kituri de diagnostic precis. Circulația liberă a informațiilor prin Internet și coordonarea globală a 10 laboratoare de către OMS a constituit o demonstrație a capacității de răspuns la un pericol iminent.

CLASIFICARE

Coronavirusurile fac parte din ordinul *nidovirales*, ce cuprinde virusuri cu genom ARNss cu polaritate pozitivă, anvelopate, grupate în 2 familii: *coronaviridae*, cu genurile coronavirus și torovirus, care infectează o serie de vertebrate determinând infecții enterice sau respiratorii, și *arteriviridae*, care determină boli ale sistemului fagocitar mononuclear. Coronavirusurile umane (HCoV) au fost asociate cu infecții respiratorii superioare, lipsite de gravitate, de tipul rinitelor. HCoV posedă cel mai mare genom ARNss cu polaritate pozitivă dintre virusurile umane (>30 kb). Aceasta implică un potențial de variabilitate enorm. În plus, structura și compoziția proiecțiilor anvelopei prezintă particularități notabile. Proiecțiile sunt oligomeri ai unei glicoproteine S, care cuplează receptorii celulari. O altă glicoproteină a anvelopei M traversează de 3 ori pătura lipidică și determină sediul intracelular al eliberării virionilor. Eliberarea se realizează prin înmugurire, proces ce facilitează achiziția în anvelopa virionilor de proteine din membrana celulei gazdă - element important în tropism.

Există 3 tipuri antigenice distincte de coronavirusuri, primele două fiind patogene pentru om și alte mamifere, iar al 3-lea doar pentru

păsări. Noul coronavirus izolat, SARS CoV a fost încadrat pe baza secvențierii genomice într-un grup aparte. Virusul este relativ stabil, își păstrează infectivitatea câteva zile pe suprafețe uscate și la pH alcalin, în materiile fecale. Coronavirusurile determină izbucniri epidemice numai la speciile de la care au fost izolate (exemplu, virusul bronșitei infecțioase aviare, coronavirusul respirator porcin etc.), deși, experimental, ele cultivă și în celule de la specii heteroloage. Curios, coronavirusurile murine au hemaglutinină care prezintă omologie de secvență cu virusul gripal C. Aceasta sugerează că un ancestor al coronavirusului hepatitei murine a achiziționat gena HA prin recombinare cu virusul gripal C. Analiza filogenetică sugerează oarecare înrudiri și între virusul hepatitei C și coronavirusul OC 43 (mai mult decât cu virusul hepatitei murine). Aceste date susțin opinia unei posibile amplificări de virulență a unui coronavirus animal odată cu depășirea barierei de specie și cu infecția umană.

Prima pandemie a secolului XXI. Între noiembrie 2002 și ianuarie 2003, în provincia Guandong din Sudul Chinei au fost înregistrate 305 cazuri de pneumonie atipică severă, cu 5 decese. Autoritățile chineze notifică Organizația Mondială a Sănătății (OMS) abia în februarie 2003, dată de la care boala, denumită sindrom acut respirator sever (SARS), se răspândește rapid în Hong Kong, Singapore, Vietnam și Canada (Toronto și Vancouver). Până în iulie 2003 s-au înregistrat peste 8 000 de cazuri cu 774 de decese. Noul sindrom, ce a afectat 26 de țări pe cinci continente, a devenit prima pandemie a secolului XXI.

Din punct de vedere epidemiologic, boala este deosebit de instructivă pentru evoluția unei viroze emergente în condițiile globalizării, urbanizării excesive, cu supraaglomerări populaționale și viteză mare de deplasare. Cazul index pentru transmiterea bolii dincolo de teritoriul Chinei continentale a fost un medic de 65 de ani, ce îngrijea pacienți bolnavi de SARS în Guangdong. La 21 februarie 2003 acesta se cazează la un hotel din Hong Kong, prezentând semnele unei afecțiuni respiratorii ce debutase cu 6 zile în urmă. Starea sănătății sale se deteriorează rapid și o zi mai târziu este internat, decedând pe 4 martie. O serie de cazuri secundare apar în spital și un număr de 17 persoane care au venit în contact cu pacientul index la hotel sunt infectate, declanșând epidemia din Hong Kong. Unii dintre contacți călătoresc spre Vietnam, Singapore și Toronto, unde devin sursa epidemiilor locale. La 28 februarie 2003 un pacient cu simptomatologie pseudogripală este internat într-un mic spital privat din Hanoi, Vietnam; 60 de membri ai personalului medical se îmbolnăvesc. Dr. Carlo Urbani, ofițerul OMS din regiune, instituie rapid carantina completă a spitalului, limitând astfel răspândirea bolii. El însuși rămâne în spital până pe data de 11 martie, când călătorește

spre Bangkok, Thailanda; în timpul zborului devine simptomatic, se autoizolează pe aeroport și decedează după 18 zile, pe 29 martie 2003. Pe 12 martie 2003, OMS instituie alertă globală, iar 3 zile mai târziu se constituie cea mai mare rețea internațională de laboratoare pentru studiul noului sindrom. În urma acestor eforturi de colaborare fără precedent, la sfârșitul lui martie 2003 agentul etiologic este identificat - este vorba de un nou coronavirus, denumit SARS CoV, al cărui genom este secvențiat complet la jumătatea lui aprilie; același virus este izolat în iunie de la animale exotice - *civet cats* - vândute în piețele din China continentală. Datele seroepidemiologice arată că virusul nu a circulat anterior în populația umană, fiind în consecință un virus nou, preluat de la animal, ce a traversat bariera de specie exemplificând modul de apariție a unei viroze emergente. La 5 iulie 2003, epidemia se stinge; de atunci nu au mai apărut decât cazuri sporadice. Raportarea unui nou caz la 5 ianuarie 2004 la un producător de televiziune din Hong Kong a dus la sacrificarea a peste 10 000 de animale (*civets cats*), considerate rezervor natural pentru SARS CoV. La sfârșitul lui martie 2004, doi cercetători de la Institutul de Virusologie din Beijing, China au fost diagnosticați cu SARS, deși nu au avut contact profesional cu coronavirusul. Institutul a fost închis pe 23.04.2004 și personalul medical a intrat în carantină. Nu au apărut cazuri secundare. Emergența SARS în sezonul 2002-2003 a reconfirmat rolul patologiei infecțioase între prioritățile de sănătate publică. Existența unor sisteme globale de supraveghere a bolilor transmisibile și, mai ales, utilizarea comunicării operative prin Internet au fost factorii determinanți în identificarea agentului patogen al SARS, în elaborarea rapidă a unui algoritm de diagnostic specific și a măsurilor corecte de control.

CLINICĂ

Câteva caracteristici ale noului sindrom s-au diferențiat rapid:

- virusul se transmite prin contact direct, respirator, prin picăturile lui Pflüge sau prin fomite, în special în mediul spitalicesc sau la contactii apropiați ai pacienților (intrafamilial și în mijloacele de transport, în mod particular în avioane);
- aerosolii generați în cursul unor proceduri medicale de tip intubație endotraheală, bronhoscopie, administrarea unor medicamente aerosolizate facilitează răspândirea bolii;
- virusul nu are transmisibilitate ridicată (spre exemplu, rata de atac în Hong Kong a fost calculată la 2:10 000 de persoane, în comparație cu 50:10 000 de persoane pentru gripă), însă unii pacienți

sunt așa numiți "*supersheeders*", eliberând concentrații foarte mari ale agentului infecțios și generând un număr impresionant de cazuri secundare;

- transmiterea fecal-orală este posibilă de la cazurile ce prezintă diaree profuză, apoasă. Într-un complex de apartamente din Hong Kong (Amoy Garden), au fost înregistrate nu mai puțin de 300 de cazuri de SARS, transmise de la un singur pacient cu diaree care a contaminat canalizarea imobilului, virusul fiind izolat din gurile de scurgere ale băilor.

OMS a stabilit o definiție de caz care include:

- febră ($>38^{\circ}\text{C}$), de cauză neexplicată;
- tuse neproductivă și/sau dispnee, urmate de instalarea detresei respiratorii rapid progresive;
- aspect radiologic de pneumonie atipică;
- istoric recent de expunere la SARS CoV (călătorii în zone cu focare de SARS sau contactul cu persoane diagnosticate cu SARS).

Alte semne clinice frecvent citate au fost frisonul, durerile musculare, cefaleea, inapetența. Diareea profuză a fost prezentă în 50% din cazurile din Hong Kong și în 20% din cele din Canada. Toți pacienții au prezentat modificări importante la radiografiile pulmonare mergând de la opacități difuze, cu aspect de sticlă mată (confundate cu tuberculoza), până la procese focale pneumonice. Nu au fost remarcate modificări interstițiale pulmonare. De altfel, autopsiile făcute au relevat procese pneumonice subpleurale greu de deosebit de bronhopneumoniile bacteriene sau virale, rapid invazive și care au cauzat moartea nemijlocit, fără insuficiență funcțională în alte organe. Limfopenia a fost un semn de laborator constant întâlnit, alături de creșteri ale unor enzime serice (LDH, ALT).

Incubația bolii variază între 2-11 zile (sau chiar peste 3 săptămâni în Canada), pacienții nu sunt contagioși în această perioadă. Concentrația maximă de virus este atinsă în ziua a 10-a, cazurile ușoare sau asimptomatice nu contribuie la transmitere. Surprinzător, copiii (chiar nou-născuții) care au venit în contact cu bolnavii nu au făcut boala. Nu au fost citate cazuri de transmitere verticală sau perinatală. Rata de fatalitate variază cu grupa de vârstă afectată, fiind sub 1% la pacienții sub 24 de ani, 6% la cei între 25-44 de ani, 15% la cei între 45-64 de ani și peste 50% la persoanele peste 65 de ani. Factorii de risc pentru evoluție severă și deces au fost vârsta și comorbidități de tip diabet, afecțiuni cardiovasculare, cancer etc.

Deși nu există în prezent un tratament etiologic, majoritatea bolnavilor cu SARS (în special cei ce s-au vindecat) au primit, în afara terapiei paliative, antibiotice, corticoizi și ribavirină intravenos. Ribavirina este un analog al ribonucleozidelor care induce "muta-geneză letală" în genomul virusurilor ARN.

DIAGNOSTIC DIFERENȚIAL ETIOLOGIC

Contagiozitatea înaltă, aspectul radiologic și limfopenia au sugerat de la început o etiologie virală. Mai mult, determinările microbiologice în spută sau aspirat bronhoalveolar au exclus etiologia bacteriană. Incubația scurtă și datele de laborator au exclus, de asemenea, infecții cu *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* (incubații peste 14 zile) sau cu *Legionella pneumophila*. Inițial s-a crezut că agentul etiologic este o tulpină de virus gripal A (H5N1), similară cu cea care a determinat gripa aviară din 1997. Ulterior, a fost implicat metapneumovirusul uman (hMPV), înrudit cu virusul respirator sincițial (VRS), ce a fost amplificat prin nested RT-PCR din spălătura bronhoalveolară sau exsudatul nazofaringian de la câțiva pacienți. hMPV fusese descoperit în 2001 și apoi izolat în special de la nou-născuții cu simptomatologie respiratorie, atât în alte țări europene, cât și în Australia și Canada. Majoritatea cazurilor de bronșiolită severă la nou-născuți, reevaluate, au demonstrat coinfecția VRS hMPV. Peste 70% din sugarii care fac bronșiolită cu insuficiență respiratorie severă, mai ales cei prematuri, au coinfecție cu cele două virusuri. Metapneumovirusul nu a fost însă izolat sistematic de la pacienții cu SARS.

Alte teste moleculare efectuate din aspiratul bronhoalveolar pentru o serie de virusuri ADN (parvo-, adeno-, circo, herpes și orthopoxvirusuri), precum și pentru virusuri ARN: (influenza A și B, parainfluenza 1, 2, 3 și 4, RSV, filovirusuri - Ebola și Marburg, arenavirusuri, virusurile rujeolos și urlian, hantavirusuri și virusul febrei hemoragice Congo-Crimeea) au fost negative.

Agentul etiologic, un nou coronavirus, a fost izolat pe culturi de celule VERO, pe care s-a obținut un efect citopatic litic, evident din ziua a 5-a postinoculare. Infecția experimentală a macacului cynomolgus cu virusul izolat a determinat o pneumonie asemănătoare SARS. Coinfecția experimentală cu hMPV sau alte virusuri nu a condus la agravarea simptomatologiei, excluzând astfel alte etiologii posibile. Teste de seroneutralizare și imunofluorescență indirectă cu serurile pacienților aflați în convalescență au confirmat etiologia: un nou coronavirus uman - SARS CoV. Virusul a fost izolat din spălătură nazofaringiană, urină, materii fecale și țesut biptic pulmonar, în concentrații maxime la sfârșitul primei săptămâni de boală. Genomul viral a fost identificat prin RT-PCR cu primeri consens pentru gena pol a coronavirusurilor, din aspirat bronhoalveolar. Microscopia electronică, atât din celule infectate, cât și din biopsii pulmonare a arătat aspectul caracteristic al coronavirusurilor - virioni mari, anvelopați, cu proiecții glicoproteice în formă de coroană solară și nucleocapside numeroase în membranele reticulului endoplasmic ale celulelor gazdă.

Concluzii

Sindromul acut respirator sever (SARS), prima pandemie a secolului XXI, constituie un exemplu încurajator pentru voința politică și posibilitățile tehnice de limitare a unei epidemii cu potențial sever. Deși s-au înregistrat global peste 8 000 de cazuri, cu o mortalitate în jur de 15%, totuși a fost remarcabilă promptitudinea cu care s-a identificat un agent etiologic nou, coronavirusul SARS CoV și cu care au fost produse kituri de diagnostic precis. Circulația liberă a informațiilor prin Internet și coordonarea globală a 10 laboratoare de către OMS a constituit o demonstrație a capacității de răspuns la un pericol iminent.

Sinteză

Coronaviridae. Virusul SARS (*sindrom respirator acut sever*).

Morfologia virionului și genomul viral: virioni sferici, anvelopați cu proiecții tipice. Diametru 120-160 nm.

Genomul: ARNss linear, sens pozitiv, aproximativ 30 kb, 7-10 cadre de citire. Ordinea genelor este: lider la capătul 5' - replicază - HE (proteina din proiecții: hemaglutinin-esterază) - spike - anvelopă - proteină de membrană - nucleocapsidă - coada poliadenilată - 3'.

Replicare: endocitoză mediată de receptor. Transcriptaza/replicaza: ARN polimerază virală. Intermediar replicativ: catena negativă (complementară) a ADN genomic. Sit de replicare: citoplasma. Eliberare din celulă prin înmugurire la nivelul aparatului Golgi.

Boli asociate: SARS la om, bronșită infecțioasă la păsări (vacin inactivat), gastroenterite la porci, feline câini, viței, șoareci.

BIBLIOGRAFIE

Tyrell DAJ, Bynoe ML. Coronavirusurile asociate cu guturaiul la om (Human Coronavirus OC43). Br. Med. J. 1965;1:1467-1470.

Lomniczi B. ARN al coronavirusurilor este infecțios. J. Gen. Virol. 1975;36: 531-533.

Cavanagh et al. ICTV face precizări privind clasificarea coronavirusurilor. Arch. Virol. 1997;142:629-633.

Grant PR et al. Izolarea noului virus SARS-CoV. N. Engl. J. Med. 2003;349:2468-69.

ORTHOMIXOVIRIDAE

De reținut:

Virioni extrem de polimorfi, 80-120 nm în diametru, cu anvelopa prezentând două feluri de proiecții: hemaglutinina și neuraminidaza. Genom ARNss cu polaritate antimesaj conținând 8 segmente.

Caractere importante: variabilitate antigenică excesivă la tipul A, rezultând din mutații și reasortări. Tulpinile pandemice apar prin reasortări care vizează în special segmentele genomice pentru HA și NA. Păsările, dar și alte mamifere, reprezintă un rezervor bogat de noi subtipuri de HA sau NA care pot fi incluse în viitoare tulpini umane. Vaccinurile gripale inactivate sau vii sunt departe de calitățile unor preparate ideale.

Istoric. Gripa (influenza sau flu, în engleză) este una din bolile cele mai răspândite și studiate. Contagiozitatea bolii a făcut ca ea să fie înregistrată încă din antichitate și din Evul Mediu. Hippocrate menționează gripa în 412 a.C. iar prima epidemie temeinic atestată datează din 1580. Termenul de influența își are originea în Italia secolului XV, unde apariția epidemiilor de gripă era atribuită *influenței* nefavorabile a astrelor. Ulterior, asocierea gripei cu sezonul rece a generat sintagma "*influenza di freddo*" care a devenit termenul preferat în lumea medicală în secolul 18. Credința populară asupra frigului drept cauză a gripei se menține și în prezent, deși sezonalitatea gripei are explicații mai complexe.

S-au numărat 31 de pandemii gripale între 1500 și 1800 rezumând următoarele caracteristici epidemiologice:

- epidemiile severe sunt relativ frecvente, însă apar la intervale imprevizibile;

- epidemiile severe sunt asociate cu mortalitate sporită la vârstnici;
- ocazional, în anumite intervale, boala dispare;
- cele mai multe pandemii provenind din Asia traversează Rusia și evoluează spre Europa (1781, 1830 etc.).

În secolul trecut au avut loc trei pandemii: 1918-19 (gripa spaniolă), 1957 (gripa asiatică) și 1968 (gripa Hong Kong).

CLASIFICARE

Virusurile gripale fac parte din familia *orthomixovirusuri*, denumită astfel după tropismul lor pentru arborele respirator. Termenul de *myxo*, din grecește *myxa*, înseamnă mucus și este comun la două familii virale: *ortho* și *paramixoviridae*. Mai important pentru biologia acestor virusuri este criteriul taxonomic actual: structura și replicarea genomului lor (ICTV, 2000). Aceste virusuri au genom ARN monospiralat cu polaritate antimesaj și sunt grupate în ordinul mononegavirale. În acest taxon sunt cuprinse cel puțin 7 familii virale de interes medical (fig. 17.1)

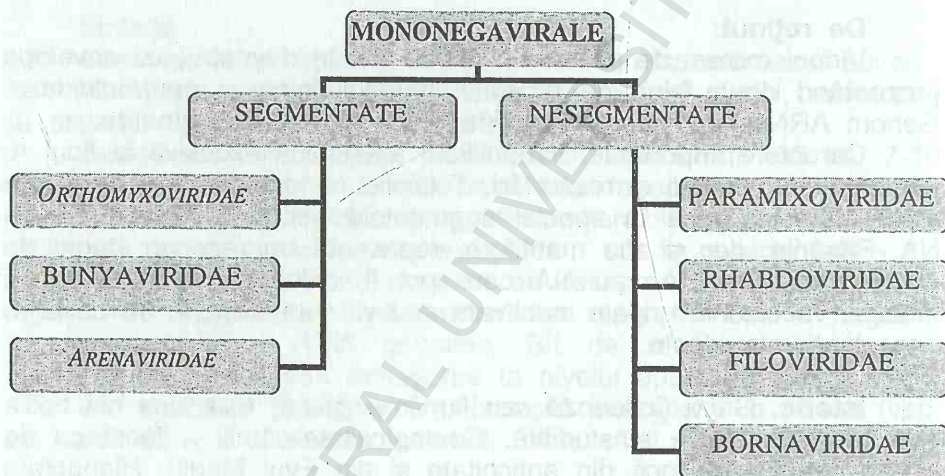


Fig. 17.1. Clasificarea ordinului mononegavirale

Orthomixovirusurile provin dintr-un ancestor comun cu paramixovirusurile păstrând mai multe similitudini (în special cu genul paramixovirus), dar există și diferențe notabile. Există trei tipuri de virusuri gripale A, B și C care nu reacționează încrucișat în testările serologice. Cele trei tipuri (genuri) de virusuri gripale se disting prin reactivitatea antigenică a proteinelor interne. Nucleocapsida și proteina matrix reacționează încrucișat în interiorul fiecărui tip, dar nu între membrii diferitelor tipuri. Alte importante caracteristici biologice fac distincția între tipuri: (a) virusurile tipului A au fost izolate de la om și de la multe specii de păsări și mamifere, în timp ce virusurile B și C sunt patogeni umani; (b) glicoproteinele superficiale ale anvelopei virusurilor gripale A înregistrează o variație antigenică excesivă în raport cu tipurile B și C; numai virusurile gripale A determină pandemii și sunt susceptibile la tratamentul cu inhibitorii proteinei de canal ionic etc. Spectrul larg de gazdă al virusurilor gripale A a determi-

nat identificarea unui număr enorm de subtipuri definite de combinații diferite între 16 hemaglutinine și 9 neuraminidaze. În interiorul fiecărui subtip sau specii există serogrupuri, tulpini, izolate, clone. Păsările acvatice sălbatice din familiile anseriforme (rațe sau gâște) sau charadriiforme (pescăruși, alte păsări din habitatul maritim) constituie rezervorul natural al acestor virusuri. La aceste specii virusul gripal nu determină simptomatologie, deși se replică și se elimină la titruri înalte, perpetuând potențialul epizootic și epidemic.

Modificările antigenice minore (antigenic drift) determină epidemii de amploare mică, în funcție de capacitatea anticorpilor existenți în populație de a neutraliza infectivitatea tulpinilor sezoniere.

Diferențe de antigenitate majore între hemaglutininele (HA) sau neuraminidazele (NA) diferitelor tulpini apar prin ceea ce se cheamă "comutarea" antigenică (*antigenic shift*), fenomen ce determină apariția noilor subtipuri (numai la tipul A). Diferențe minore de antigenitate apar prin "alunecare" antigenică (*antigenic drift* - la toate tipurile) și facilitează modificarea tulpinilor sezoniere.

Modificările antigenice majore (*antigenic shift*) determină epidemii de amploare pandemică, pentru că surprind populația fără experiență imunologică. Apariția shiftului antigenic și, implicit, a tulpinilor pandemice a fost explicată prin trei mecanisme: reasortarea genică (i), străbaterea barierei de specie și adaptarea la om a unei tulpini de origine animală (ii), reciclarea unei tulpini vechi conservate într-un mod puțin explicat (iii).

Mai multe particularități ale tulpinilor gripale de tip A explică potențialul lor pandemic. În primul rând, existența tulpinilor A la multiple specii domestice și sălbatice de păsări sau mamifere. Sursa numeroaselor subtipuri A este reprezentată de păsările acvatice care fac forme persistente, asimptomatice și care pot furniza un rezervor genetic perpetuu pentru variabilitatea tulpinilor de tip A. În al doilea rând, tipul A este răspunzător de majoritatea epidemiilor sezoniere care modifică imunitatea colectivității și favorizează drifturile antigenice repetate. Driftul antigenic reprezintă strategia de supraviețuire a tulpinilor gripale în populație. În al treilea rând, natura segmentată a genomului ARN gripal asigură o flexibilitate deosebită genomului care poate fixa mutații răspunzătoare de modificarea patogenității.

MORFOLOGIA VIRIONULUI ȘI STRUCTURA GENOMULUI

Virionii gripali, cu un *polimorfism* remarcabil, pot fi de formă sferică (dimensiuni de 80-120 nm diametru) sau filamentoasă (de sute nm). Cultivarea în linii celulare produce predominant forme filamentoase. În ansamblu, virionii pot fi asemănați cu mici arici, prezența proiecțiilor superficiale (spiculi sau țepi) fiind caracteristică. În interior, virionii prezintă o nucleocapsidă helicoidală, înglobând genomul for-

mat din *opt segmente de ARN monocatenar cu polaritate antimesaj*, având o greutate moleculară totală de 500 kDa. Fiecare segment este o *minigenă* responsabilă de codificarea proteinelor virale structurale și nonstructurale. La exterior, anvelopa conține lipide/glicolipide și glicoproteine parțial derivate din membrana plasmatică a celulei gazdă, parțial codificate de genomul viral. Pe suprafața anvelopei sunt dispuse proeminențe în formă de spiculi (*spikes*) - peplomere - cu care virionul se atașează de celulele receptoare (fig. 17.2).

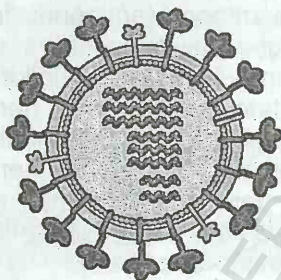


Fig. 17.2. Structura virionului gripal. A se nota structura segmentată a genomului ARNss negativ și prezența mai multor feluri de proiecții (HA, NA, M2) pe anvelopă.

Organizarea genomului gripal

Genomul virusurilor gripale umane (fig. 17.3) cuprinde 8 minigene care codifică glicoproteinele anvelopei, hemaglutinina și neuraminidaza, o ribonucleoproteină (NP), complexul polimerazic (PA, PB1 și PB2), proteina matrix M1 și o proteină cu rol de canal ionic M2.

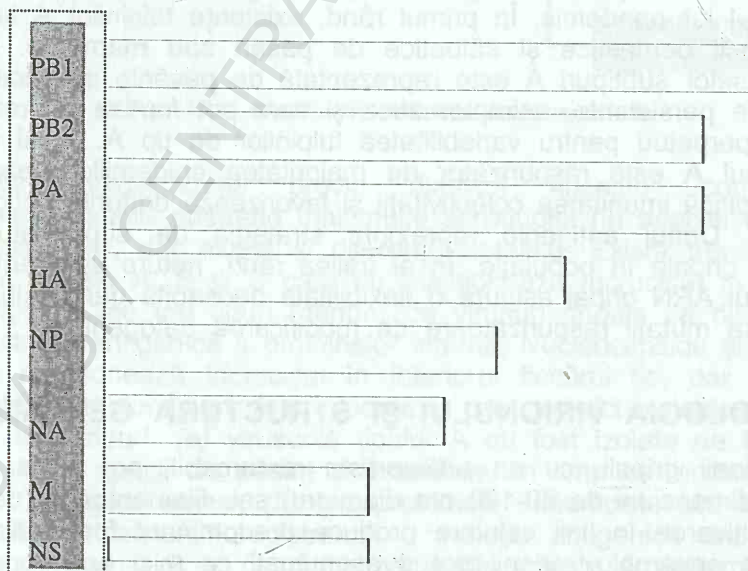


Fig. 17.3. Organizarea genomului gripal uman de tip A sau B.

Diferențele antigenice în nucleoproteină (NP) și în proteina matrix (M1) permit clasificarea virusurilor gripale în cele trei genuri A, B și C. Genul (tipul) A de virus gripal este subtipizat pe baza antigenității HA și NA în mai multe specii.

Fiecare segment codifică o proteină, însă unele minigene pot fi citite în două feluri, pornind de la codoni start diferiți rezultând două proteine diferite (exemplu, M1 și M2). Segmentele genomice au secvențe terminale comune la capete care realizează structuri complementare ce solidarizează întregul genom.

REPLICAREA VIRUSULUI GRIPAL

Virusul gripal intră în celula gazdă după ce hemaglutinina (HA) cuplează receptorii de acid sialic de la nivelul membranei. Molecula precursor HA suferă un clivaj proteolitic mediat de enzime ale celulei gazdă rezultând subunitățile HA1 și HA2. Activarea postproteolitică a hemaglutininei este esențială pentru infectivitate, pentru diseminare-excreție și pentru virulență. În urma procesului de endocitoză mediată de receptor, virionii sunt decapsidați în veziculele endosomale, acidifiolate datorită rolului de canal protonic al proteinei virale M1. Complexul ribonucleoproteinic decapsidat este transferat în nucleu, unde sunt sintetizate proteinele enzimactice necesare replicării. După traducerea proteinelor se sintetizează copiile pozitive ale celor 8 segmente genomice (7 la tipul influenza C), iar pe intermediarul replicativ ARNds se sintetizează segmentele genomului progen. Fiecare segment al genomului gripal funcționează ca o unitate de transcriere separată în nucleu. Exportul din nucleu în citosol și traficul ulterior către membrana citosolică al celulei. La nivelul membranei celulare are loc procesul de asamblare și eliberare a virionilor progeni, proces în care sunt implicate glicoproteinele superficiale (HA și NA) și proteina de canal ionic M1. De notat că etapele inițiale și finale ale ciclului replicativ se produc la același pol apical al celulei gazdă.

Obținerea de variante atenuate de virus gripal

Cultivarea virusurilor gripale la temperaturi progresiv scăzute (până la 25°C) generează variante reci, sensibile la temperatură și atenuate la șoarece sau om. Acestea au mutații în proteinele interne ale virionului. Coinfecția tulpinilor reci cu tulpini sălbatice circulante permite selecția de reasortanți cu caracterele de atenuare ale tulpinilor reci și cu antigenitatea tulpinilor sălbatice. Acești reasortanți au fost folosiți ca tulpini "master" pentru producția de vaccinuri vii atenuate. Numărul mic de aminoacizi schimbați în proteinele interne ale

virusurilor atenuate ridică probleme asupra stabilității lor și asupra riscului potențial de a da revertanți la fenotipul sălbatic. Strategiile de genetică inversă aduc un plus de certitudine în generarea tulpinilor atenuate datorită introducerii de mutații multiple. Atenuarea a fost obținută prin mutații localizate la nivelul proteinelor nonstructurale din complexul polimerazic.

Replicarea artificială a virusurilor gripale prin genetică inversă

Informații suplimentare privind replicarea virusurilor gripale au fost obținute prin procedeele de genetică inversă. Termenul de genetică inversă (*reverse genetics*) este utilizat în virusologia moleculară pentru a descrie generarea artificială a unui virus din genomul lui clonat într-o copie ADN (cDNA). Primul sistem de genetică inversă a fost stabilit de Racaniello și Baltimore, 1980, pentru virusul polio, virus cu genom ARNss cu polaritate pozitivă. Palese și colab., 1989, au stabilit primul sistem "*reverse genetics*" pentru virusul gripal cu genom ARNss(-).

CLINICĂ

Gripa

Este cea mai frecventă infecție acută a căilor respiratorii. Se estimează că în fiecare sezon cald-rece (noiembrie - aprilie) între 10-20% din populație face un episod gripal. Copiii sunt de 2-3 ori mai susceptibili decât adulții. În România, până la 20 000 de cazuri necesită anual spitalizare, iar peste 2 000 de decese sunt atribuite gripei (mai ales la vârstnicii peste 65 de ani sau la bolnavii cu cord pulmonar cronic). Datele de mai sus se amplifică de 3-5 ori în cursul epidemiilor de gripă. Simptomatologia este criteriul cel mai frecvent de diagnostic. Simptomele generale (frisoane, febră, dureri musculare, dureri de cap) domină simptomele respiratorii (tuse uscată, nas înfundat etc.). Simptomele debutează la 1-2 zile de la contactul infectant, durează 4-5 zile, după care urmează convalescența cu sau fără complicații.

Complicațiile cele mai frecvente sunt:

- pulmonare: pneumonii primitiv virale sau secundar bacteriene;
- cardiace: fribilații care conduc la decompensare, rar mio- și pericardite;
- rhabdomioliză, care poate precipita insuficiența renală;
- nervoase: encefalită sau mielită transversă;
- la copil: otită medie, crup și miozite.

Incubația gripei este între una și cinci zile, în funcție de doza infectantă și statusul imun. La adulții imunocompetenți spectrul clinic variază de la simptome minore ale tractului respirator superior, până

la pneumonii severe, uneori, rapid fatale. Infecția experimentală a voluntarilor sănătoși a determinat doza infectantă 50% la om prin instilație intranasală care corespunde la 127-320 de doze infectante 50% pe culturi celulare (DIC₅₀). Infecția gripală se transmite mult mai eficient prin aerosoli decât prin instilație intranasală. Conținutul infectant într-o particulă aerosolizată cu diametrul sub 3 μm este sub 3 DIC₅₀. Mulțimea particulelor de aerosoli eliminate prin tuse sau strănut fac din gripă una dintre cele mai contagioase viroze, de unde denumirea latină *influenza*.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIA GRIPALĂ

Obișnuit, clinicienii pun diagnosticul de gripă pe baza informațiilor epidemiologice și a simptomelor pe care subiectul le acuză. Utilizarea testelor de laborator pentru izolarea și identificarea virusului este importantă în câteva situații particulare: în epidemie, la bolnavii din grupele de risc pentru apariția complicațiilor, pentru aprecierea oportunității administrării de antivirale. De la orice test de diagnostic se cere furnizarea unor informații utile și reproductibile cu un preț de cost acceptabil. În prezent, este remarcabil interesul pentru dezvoltarea unor metode rapide și fiabile de identificare a virusurilor respiratorii. Metodele rapide permit confirmarea diagnosticului clinic la patul bolnavului sau în ambulator, însă nu au sensibilitatea metodelor clasice de diagnostic: izolarea virusului, evidențierea antigenului prin imunofluorescență (IF) sau imunoenzimatic (EIA), evidențierea genomului viral prin RT-PCR sau prin *real time* PCR. Mai recent, tehnologia *microarray* (micromozaiicului) a fost utilizată pentru detecția rapidă a diversității genice a izolatelor gripale. Determinarea eventualelor recombinanți rezultați în urma infecțiilor simultane cu tulpini umane și aviare este importantă în planul de acțiune pentru prevenirea pandemiilor gripale.

Testul patognomonic sau testul standard "de aur" în diagnosticul gripei este izolarea virusului. El asigură proba decisivă (ideală) pentru diagnostic și împarte subiecții în bolnavi (TP - adevărați pozitivi în celelalte teste) și sănătoși (TN - adevărați negativi).

Rememorarea procedurii clasice de diagnostic virusologic în gripă

Eșantioanele colectate de la bolnav (spălătura nazofaringiană, aspiratul nazal - la copilul mic), aspiratul traheobronșic, sputa sau lichidul de gargară sunt diluate *ana partae* sau mai puțin în mediul de transport. Mediul de transport conține 0,5% gelatină, antibiotice și bulion (*tryptic soy broth*). Specimenele se transportă la laborator pe gheață (+4°C), necongelate, în maximum 24 de ore. O parte (aliquot)

din eșantion se utilizează pentru diagnostic, iar un alt aliquot de 0,5 ml se păstrează pentru repetarea sau confirmarea rezultatului. Opțiunea pentru un test sau altul poate fi diferită la copil sau adult (Frisbie și colab., 2004). De regulă, procedura de diagnostic urmează patru direcții:

- izolarea în culturi de celule sau ou de găină embrionat (OGE);
- detecția antigenelor virale prin imunofluorescență (IF);
- detecția imunoenzimatică (EIA) a antigenelor virale;
- evidențierea genomului viral prin RT-PCR.

Trebuie reamintit că sensibilitatea diferitelor tehnici de diagnostic sau a reactivilor utilizați poate varia în raport cu particularitățile fenotipice ale tulpinilor circulante.

Metode de diagnostic rapid în gripă. În anii din urmă, evidențierea directă a antigenelor virale a devenit posibilă prin metode rapide care dau rezultatul în mai puțin de 30 de minute. Testele rapide de diagnostic în gripă sunt teste imunoenzimatică și, în funcție de performanțe, detectează numai antigenele gripale de tip A (1), detectează antigenele A și B fără a le diferenția (2) sau detectează și diferențiază cele două tipuri de virus (3).

Performanța testelor rapide, ca și a altor metode de diagnostic este definită în comparație cu rezultatul unui test standard, reprezentat, de obicei, de izolarea virusului în culturi. Patru mărimi definesc acuratețea clinică a testelor rapide (Johnston și Bloy, 1993):

- sensibilitatea - procentajul cazurilor "adevărate" de gripă detectate pozitive,
- specificitatea - procentajul cazurilor infirmate clinic, detectate negative,
- VPP - valoarea pozitiv predictivă - procentajul cazurilor testate pozitiv care au clinic gripă,
- VNP - valoarea negativ predictivă - procentajul cazurilor testate negativ care nu fac gripă.

În general, sensibilitatea testelor rapide este 70% (mai mică decât în cazul izolărilor), în timp ce specificitatea este peste 90%.

PATOGENIA INFECȚIEI GRIPALE

Relația dintre virusurile gripale și organismul gazdă implică o varietate de mecanisme care, pe de o parte, stimulează mecanismele imunitare de apărare, iar, pe de altă parte, favorizează sau susțin replicarea virală și contracarează mecanismele de apărare. Nu o singură genă virală, ci o constelație de gene condiționează virulența. Nu numai achiziția unor gene întregi modifică virulența, ci chiar mutații punctiforme în anumite gene. HA și NA sunt principalii factori de virulență și de competență replicativă virală (*viral fitness*). Aceste glico-

proteine superficiale contribuie la lărgirea tropismului tisular și la declanșarea răspunsului inflamator. Pe scurt, NA facilitează eliberarea virionilor din celula gazdă și digeră inhibitorii nespecfici, mucoproteici de la nivelul tractului respirator. Inhibitorii de neuraminidază sunt principalele medicamente utilizate în terapia și profilaxia gripei. HA permite atașarea virusului gripal la receptorii hematiilor și celulelor susceptibile. În plus, HA induce anticorpii protectori. O tulpină gripală care a suferit mutații în HA are, de regulă, mutații compensatorii în NA pentru a-și menține virulența. Competența replicativă (*viral fitness*) și virulența sunt reduse la tulpinile rezistente la inhibitorii de neuraminidază.

IMUNITATEA ÎN INFECȚIA GRIPALĂ

O componentă importantă a imunității în gripă este reprezentată de efectorii imunității nespecifice (interferoni și alte citokine) care oferă o barieră mobilizată rapid postinfecție, importantă atât per se, cât și pentru sinergia cu efectorii imunității specifice. Răspunsul timpuriu înăscut explică simptomatologia sistemică brutală a debutului gripal. Sinteza de citokine, influxul de granulocite și celule NK, activarea unor receptori la nivelul epitelului respirator pregătesc terenul pentru edificarea răspunsului imun adaptativ. Virusurile gripale sunt inductori eficienți de interferon atât în secrețiile respiratorii, cât și în ser. Interferonul se detectează după prima zi de gripă și atinge vârful în ziua a 4-a. Există o corelație pozitivă între titrul viral, răspunsul febril și concentrația de interferon. Mulți autori explică febra inițială ca reacție adversă la sinteza endogenă de interferon. La fel, in vitro, limfocitele pacienților cu gripă, stimulate cu antigen viral purificat, sintetizează interferon, proprietate fructificată într-un test important de evaluare a răspunsului imun celular - ELISPOT. Interferonii alfa și gamma sintetizați contribuie la vindecare. Efectorii imuni cei mai importanți pentru vindecare sunt însă anticorpii neutralizanți anti-HA sau anti-NA. Numai acești anticorpi sunt asociați cu protecția indusă de boală sau vaccinare și nu anticorpii anti-proteină M sau anti-NC (nucleocapsidă). Persistența anticorpilor protectori, în absența boosterului (reinfectiei), este estimată la 5-6 luni. Infecțiile repetate sau vaccinările repetate cresc titrul și persistența anticorpilor.

Anticorpii sunt sintetizați local dar și transsudează din ser. Există o corelație directă între nivelul IgG seric și nivelul anticorpilor din secreția nazofaringiană. Transsudarea este limitată, iar raportul ser/secreții al anticorpilor este 350/1. În răspunsul imun primar se detectează toate clasele de anticorpi IgM, IgA, IgG, iar în răspunsul secundar numai clasele IgG și IgA. Anticorpii transmiși transplacentar sunt răspunzători de rezistența sugarului în primele 6 luni de viață.

Anticorpul anti-HA previne infecția/reinfecția prin neutralizarea virusului (cel secretor, chiar la poarta de intrare). Anticorpul anti-NA intervine după inițierea infecției, diminuând diseminarea virusului către tractul respirator inferior.

Infecția gripală determină în primele 3 zile o neutropenie moderată care se amendează în cazul suprainfecțiilor bacteriene (criteriu diagnostic). Infecția gripală are un oarecare efect anergizant, evidențiat de scăderea reactivității față de antigene comune administrate intra-dermic.

Citoliza celulelor epitelului respirator purtătoare de virus este mediată de anticorpi și complement, dar și de limfocitele citotoxice CD8 pozitive. Limfocitele CD8 pozitive recunosc atât antigenele superficiale, cât și cele interne ale virionului. Limfocitele de memorie au o specificitate cu spectru mai larg, putând crossreacționa cu subtipuri înrudite de virusuri gripale. Limfocitele de memorie ating un vârf în ziua 14 postinfecție și se mențin 4-6 luni. Limfocitele CD4 pozitive au două funcții majore: helper pentru limfocitele B sintetizatoare de anticorpi și helper pentru limfocitele CD8 citotoxice. Este interesant că limfocitele helper sensibilizate cu antigenele interne stimulează și sinteza de anticorpi anti-HA.

Răspunsul imun adaptativ necesită câteva zile pentru a fi efektiv, dar beneficiază de prezența mediatorilor nespecfici deja mobilizați. Subliniem că efectorii imunității adaptative sunt specifici de tip, subtip sau izolat și au rareori capacitatea de-a reacționa încrucișat.

Studiul răspunsului imun în gripă a lămurit câteva probleme controversate:

- mecanismul simptomelor sistemice atât de pregnante într-o infecție localizată în tractul respirator;
- explicația reinfecțiilor frecvente, în ciuda prezenței efectorilor imuni;
- vulnerabilitatea vârstnicilor și a bolnavilor cu afecțiuni pulmonare cronice;
- reacțiile adverse la vaccinul inactivat preparat cu virus întreg;
- perspectiva unui vaccin antigripal cu spectru protector larg etc.

Unele tulpini virale au dezvoltat mecanisme de eludare a răspunsului imun înăscut. Proteina NS1, de exemplu, antagonizează efectul interferonului și sechestrează ARNds, moleculă recunoscută ca inductor de IFN.

Cazurile umane de infecție cu tulpini aviare H5N1 au precizat o serie de factori care contribuie la evoluția clinică deosebit de severă. Manifestările caracteristice gripei H5N1 sunt sindromul de insuficiență respiratorie severă și disfuncția mai multor organe. Limfopenia și hemofagocitoza sugerează dereglarea balanței citokinelor cu prevalența celor proinflamatorii. Bolnavii cu gripă H5N1 au niveluri serice mari ale chemokinelor IP-10 (*interferon-gamma inducible protein 10*) și ale MIG (*monokine induced by interferon gamma*). În plus,

toate virusurile gripale de tip A induc sinteza unor citokine proinflamatorii ca IL-6, IL-8 și RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*). Hipersinteza citokinelor/chemokinelor explică virulența excesivă a tulpinilor H5N1 în general și a genotipului Z (A/H5N1/2004) în special. Hipersinteza este dependentă de replicarea virală căci virusurile inactivate nu au acest efect.

VACCINAREA ANTIGRIPALĂ

Există două opțiuni în vaccinarea antigripală: vaccinuri inactivate sau vaccinuri vii atenuate. Fiecare opțiune are avantaje și limite. Tabelul 17.1 rezumă diferențele dintre cele două modalități de vaccinare, însă trebuie precizat că experiența practică și proba timpului au făcut ca vaccinurile inactivate să fie preferate. Vaccinul inactivat poate conține virusul întreg sau numai subunitățile antigenice. În unele protocoale se purifică numai hemaglutinina, care este unicul component antigenic (vaccin subunitar sau splitat). În acest caz, virusul este tratat cu detergenți care solubilizează anvelopa și componentele ei glicoproteice. În general, imunogenitatea celor două feluri de vaccin inactivat - cu virus întreg sau subunitar - este asemănătoare.

Conținutul antigenic al vaccinurilor vii și inactivate este identic. În prezent, el cuprinde trei antigene diferite corespunzătoare tulpinilor gripale circulante în sezonul respectiv. Vaccinurile antigripale inactivate folosite interpandemic sunt trivalente și conțin câte 15 mg de antigen hemaglutinant pentru fiecare componentă A/H1N1, A/H2N3 și B. Doza recomandată pentru adulți este unică, 0,5 ml, injecție intramusculară. Pentru copii se recomandă două doze 0,5 ml (numai 0,25 ml pentru cei sub 4 ani) la interval de 4-6 săptămâni. Vaccinarea antigripală se face optim în intervalul octombrie-noiembrie. În pandemie vaccinul folosit va fi monovalent, preparat numai cu tulpina pandemică.

TABELUL 17.1

COMPARAȚIE ÎNTRE VACCINURILE ANTIGRIPALE VII ȘI INACTIVATE

Criteriu	Vaccinuri vii	Vaccinuri inactivate
Cale de administrare	Intranazal, bucal	Intramuscular
Vârsta recomandată	5-49 ani	Peste 6 luni
Replicarea virusului la vaccinați	Da	Nu
Imunizarea contactilor	Da	Nu
Risc producție recombinanți	Da	Nu
Oportunitatea altor vaccinuri simultane*	Da	Da
Administrare la imunosupresați**	Nu	Da

*Dacă alte vaccinuri nu sunt administrate simultan, se recomandă păstrarea unui interval de o lună până la administrarea următorului vaccin.

**Vezi textul pentru detalii.

Fiecare doză de vaccin conține hemaglutinina corespunzătoare la 10 bilioane de virioni în cazul cultivării virusului pe ou de găină embrionat. Studii moleculare asupra tulpinilor umane cultivate pe ou de găină embrionat au evidențiat mutații care reflectă adaptarea virusului la acest substrat. Din fericire, aceste mutații nu alterează antigenitatea.

Vaccinurile antigripale sunt reînnoite anual în acord cu tulpinile gripale A/H1N1, A/H3N2 și B, prevalente. OMS recomandă tulpinile care să fie utilizate în producția vaccinului gripal. Aceste recomandări sunt făcute în avans față de sezonul gripal pentru a permite producătorilor prepararea stocurilor sămânță: în februarie pentru emisfera nordică, în septembrie pentru emisfera sudică.

Vaccinul gripal viu atenuat (VGVA). Eficiența limitată a vaccinului inactivat și lipsa unui răspuns adecvat la revaccinările anuale au reînnoit interesul pentru VGVA. În plus, comparativ cu vaccinul inactivat, VGVA are o serie de avantaje în privința producției dar, mai ales, a administrării. Inocularea intranasală sau per os îl face ușor de administrat și acceptat, iar reacțiile adverse sunt minime. Infecția naturală și infecția promovată de VGVA este superioară vaccinului inactivat în ceea ce privește spectrul neutralizant mai larg al anticorpilor induși.

Recent, americanii au optimizat o veche tehnologie sovietică din anii 60, recomandând un vaccin viu atenuat administrabil intranasal numit FluMist® MedImmune Inc. Acesta din urmă este recomandat persoanelor sănătoase între 5-49 de ani. Sub și după aceste limite de vârstă se recomandă numai vaccinuri inactivate. Vaccinul FluMist conține mutante virale reci, sensibile la temperatura de 37°C și este complet lipsit de reacții adverse.

GRIPA ÎN ROMÂNIA

Datele comunicate www.eiss.org în ultimii ani indică o prevalență moderată a activității gripale (cu excepția sezonului 2004-5) în România. Vârful activității gripale se situează în martie, iar tulpinile izolate aparțin, mai ales, subtipului A/H3N2. Aceste tulpini dau infecții mai severe la copiii sub 5 ani, crupul fiind o formă clinică ce reclamă spitalizări prelungite. Tulpinile din subtipul H1N1, ca și tulpinile de tip B dau infecții mai blânde la copii și la adulții tineri. În România, caracteristicile epidemiologice ale gripei înregistrează diferențe regionale semnificative. Epidemiile debutează în urban, în orașele mari, unde și impactul social și economic este mai important. Acoperirea vaccinală este insuficientă și circumscrisă la grupele cu risc. Anii epidemici (1997, 2000, 2004) înregistrează un plus de morbiditate de peste patru ori față de sezoanele interepidemice. În anii epidemici se înre-

gistrează un număr estimativ de 90-120 000 de cazuri, reprezentând între 15-30% din totalul infecțiilor acute ale căilor respiratorii superioare. Procentele sunt mai mari la preșcolari și școlari. De asemenea, în anii epidemici este evidentă diferența de morbiditate pe grupe de vârstă, copiii sub 5 ani fiind cei mai afectați. Gripa este singura infecție respiratorie acută care determină exces de mortalitate. Decesele vizează grupele extreme de vârstă: sub 5 ani și peste 65 de ani. Se apreciază că în anii interpandemici 1 din 2 200 de subiecții peste 65 de ani decedează din cauza gripei, cifră care crește de aproape 8 ori în anii pandemici, la 1 din 300.

MEDICAMENTE PENTRU TRATAMENTUL INFECȚIEI CU VIRUSURI GRIPALE

Antiviralele ocupă un loc important și în tratamentul gripei sezoniere la persoanele cu risc sau în situații în care beneficiul este evident superior costului. Fără a fi un substitut al vaccinării antigripale, aceste medicamente oferă protecție în cazul lipsei vaccinării sau nepotrivirii antigenice între tulpinile vaccinante și circulante. Cele două clase de medicamente disponibile inhibă ciclul replicativ în etape diferite:

- adamantanii (inhibitorii proteinei de canal ionic) în faza timpurie a decapsidării (*amantadina* și *rimantadina*),
- inhibitorii neuraminidazei în faza tardivă a eliberării virusului (*oseltamvir* și *zanamivir*).

În practică, tratamentul gripei cu antivirale ridică câteva probleme. Tratamentul trebuie să înceapă în primele 24-36 de ore de la debutul simptomelor. Mulți pacienți întârzie să se prezinte la medic pentru că își autoadministrează paracetamol sau alte antitermice care le amendează tranzitoriu simptomele. Aglomerarea medicilor de familie în cursul epidemiilor de gripă constituie un alt obstacol în prescrierea medicamentelor antigripale. Costul acestora nu este neglijabil: pentru o zi de tratament cu amantadină se cheltuiesc 0,5 \$, pentru rimantadină 5 \$, iar pentru oseltamvir 7 \$. Testele rapide au contribuit la diferențierea gripei de alte viroze respiratorii acute, sporind proporția celor ce beneficiază de un tratament specific.

Apariția tulpinilor virale rezistente la amantadină și rimantadină a atins proporții îngrijorătoare, probabil datorită folosirii nediscriminate și subdozate. Utilizarea din ce în ce mai largă a oseltamvirului în profilaxie va contribui la diseminarea tulpinilor rezistente. Studiile care argumentează crearea unor stocuri de oseltamvir pentru eventualitatea unei pandemii au contribuit la comercializarea acestui medicament fără a aduce informații noi privind pericolul rezistenței sau al unor reacții adverse ignorate până recent.

PLANUL DE PREGĂTIRE ȘI RĂSPUNS ÎN CAZ DE PANDEMIE GRIPALĂ

Comisia Europeană în colaborare cu Grupul de lucru privind gripa (EIWG) a publicat și supus aprobării Parlamentului European planul de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală. În document, o pandemie gripală este definită ca un eveniment epidemiologic caracterizat de circulația globală a unui nou subtip gripal în populația lipsită de experiență imunologică anterioară sau a unui virus gripal care determină morbiditate și mortalitate care excedă semnificativ nivelul epidemic sezonier mediu. Din punct de vedere al sănătății animale, planul de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală trebuie însoțit de controlul gripei aviare la păsările domestice și sălbatice. În condițiile epizootice actuale, coordonarea planurilor veterinare și umane este un factor crucial datorită posibilității legăturii directe cu pandemia umană. Controlul gripei aviare este o prioritate epidemiologică, ecologică și economică impunând măsuri stricte de supraveghere coordonate cu planul de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală umană.

Principiile, obiectivele și componentele planului pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală. Planul de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală ia în considerare recomandările OMS cuprinse în "Influenza Pandemic Plan" și recomandările planurilor regionale și naționale.

Scopul măsurilor preconizate constă în:

- minimizarea riscului izbucnirii pandemiei;
- asigurarea pregătirilor logistice în caz de pandemie;
- coordonarea răspunsului comunitar și al diferitelor agenții internaționale (OMS, FAO, OIE etc.).

Obiectivele planului de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală pot fi rezumate astfel:

- Facilitarea unui răspuns prompt în caz de pandemie (în primele 2-4 zile de la apariția cazurilor sau până la agregarea a 20-30 de cazuri).
- Reducerea vulnerabilității sănătății publice prin limitarea excesului de morbiditate și mortalitate determinate de gripă.
- Reducerea panicii sau temerii în rândul populației și al personalului medical.
- Limitarea dezorganizării activității publice normale.
- Reducerea elementelor conflictuale între planurile naționale sau ale diferiților actori.

Componentele planului de pregătire și răspuns în caz de pandemie gripală sunt precizate astfel în documentele OMS și ale Comisiei Europene (www.who.int/gb/EB_WHA/pdf).

Sinteză

Morfologia virionului gripal: talie 80-120 nm, sferic, pleomorf. Componente structurale: anvelopă cu două feluri de proiecții: HA și NA și nucleoproteina (NP).

Genom: ARNss, 8 segmente, polaritate antimesaj; 10 cadre de citire. Organizarea genomului: PB2-PB1-PA (subunități polimerazice) - hemaglutinina (HA1+HA2) - nucleoproteina (NP) - neuraminidaza (NA) - proteina matrix (M1+M2) - proteine nonstructurale (NS1+NS2)

Replicare: internalizare: endocitoza mediată de receptor și fuziune cu membrana celulară. Receptor: N acetil-9-O-acetilneuraminic acid. Situl replicării: nucleu. Transcriptaza virală ARN-dependentă de ARN. mARN are un "cap" alcătuit din 12-14 nucleotide, derivat din ARNm celular la terminația 5'. Replicaza virală ARN dependentă de ARN; intermediar replicativ: ARN (+) complementar. Asamblare în citoplasmă. Eliberare prin înmugurire la capătul luminal al celulelor polarizate ale epitelului respirator.

Biologie: tropism: epitelul cailor respiratorii. ECP: necrotic, hemadsorbție

Particularități ale virusului influenza C. Genom cu numai 7 segmente; proiecțiile HA aranjate în grupe hexagonale; frecvente forme filamentoase ale virionilor; tropism pentru om și porc.

BIBLIOGRAFIE

- Hirst GK. Descoperirea hemaglutinării cu virusuri gripale. Science 1941;94:22-23.
- Taylor RM. Izolarea virusului gripei umane C/JJ/50. Am. J. Publ. Hlth. 1949;39:171-178.
- Hirst GK. Demonstrarea rezidiilor de acid sialic ca receptor pentru virusurile gripale. J. Exp. Med. 1950;91:177-184.
- Burnet FM et al. Descoperirea reasortării genetice la virusurile gripale. Austr. J. Sci. 1949;12:109-110.
- Gottschalk A. Descoperirea neuraminidazei la virusurile gripale. Nature 1958;181:377-378.
- Linnemann et al. Asociere sindromului Raye cu infecția gripală, 1974.
- Pinto LH et al. Descoperirea activității de canal ionic pentru proteina gripală M2. Cell 1992;69:517-528.
- Barclay, Palese. Elaborarea sistemului de genetică inversă pentru producția tulpinilor vaccinante. PNAS, 1999.
- Neumann G. et al. Generarea artificială a virusului gripal din cDNA. PNAS 1999;96:9345-9350.
- Taubenberger JK et al. Recrearea tulpinii pandemice 1918. Nature 2005;437:889.

INFECȚIA UMANĂ CU TULPINI DE GRIPĂ AVIARĂ

De reținut:

În raport cu mortalitatea determinată de infecția naturală, dar și cu leziunile și severitatea infecțiilor experimentale, tulpinile de gripă aviară (*avian influenza* - AI) se împart în două grupuri majore: slab patogene (*low pathogenic*) - LPAI, și înalt patogene (*high pathogenic*) - HPAI. Proprietăți ale hemaglutininei virale, precum: afinitatea pentru receptori, susceptibilitatea la diferite proteaze, inserția aminoacizilor bazici la situl de clivaj HA1/HA2 etc. au fost asociate virulenței. Experiența arată că virusurile gripale aviare pot traversa sporadic bariera de specie adaptându-se la gazde noi (canine, feline, om etc.). În cele mai multe cazuri de transmitere la om fenomenul este de tip fund de sac (*dead-end*), în sensul imposibilității diseminării interumane.

ECOLOGIA VIRUSURILOR GRIPALE

Mult timp, transmiterea virusurilor aviare la om a părut un fenomen puțin probabil. Observații făcute în cazul unor epizootii la pui de găină crescuți în ferme au indicat lipsa seroconversiei la îngrijitori. Doze mari de virus gripal aviar au trebuit inoculate la voluntari umani pentru a genera îmbolnăviri și seroconversie. Totuși, după episodul din Hong Kong 1997 (unde s-au înregistrat primele infecții umane letale cu gripa aviară), au apărut numeroase indicii privind posibilitatea transmiterii directe a virusurilor gripei aviare H5N1 la om, fără generarea de reasortanți între tulpini umane și aviare sau fără gazde intermediare. O sinteză a scenariilor posibile pentru susținerea infecției umane cu tulpini de la alte specii este redată în tabelul 18.1.

Păsările sălbatice sunt rezervorul de virusuri gripale A pentru toate mamiferele susceptibile. Natura segmentată a genomului gripal face posibilă apariția relativ frecventă a reasortanților între tulpini de

TABELUL 18.1

MODELE DE GENERARE A TULPINILOR PANDEMICE UMANE

Model	Mecanism de selecție	Exemplu posibil
Reasortant tulpini porc-om	Afinitate HA pentru receptori umani	H1N1 în 1977
Reasortant tulpini porc-aviare-umane	Afinitate HA pentru receptori umani și aviari	H3N2 în 1994 în Olanda
Reasortant tulpini aviare-umane	Mutații în HA care sporesc sensibilitatea la proteaze	Pandemia asiatică H2N2 în 1957 sau pandemia Hong Kong în 1968
Mutant aviar infectant și transmisibil interuman	Mutații în HA, NA și alte gene care sporesc infectivitatea pentru om	Pandemia spaniolă H1N1/1918 sau viitoarea pandemie (200?)

gripă A umană, porcină, ecvină și tulpinile aviare. Aceasta este sursa variabilității deosebite a virusurilor gripale de tip A. De notat că și în laborator se produc frecvent infecții umane având drept sursă animalele de experiență (șoareci, dihoari) inoculate sau invers, transmiterea infecției de la om la animalul de experiență.

În raport cu mortalitatea determinată de infecția naturală, dar și cu leziunile și severitatea infecțiilor experimentale, tulpinile de gripă aviară (*avian influenza* - AI) se împart în două grupuri majore: slab patogene (*low pathogenic*) LPAI și înalt patogene (*high pathogenic*) HPAI. Proprietăți ale hemaglutininei virale, precum: afinitatea pentru receptori, susceptibilitatea la diferite proteaze, inserția aminoacizilor bazici la situl de clivaj HA1/HA2 etc. au fost asociate virulenței.

Tulpinile aviare de gripă constituie sursa tulpinilor izolate de la un spectru larg de gazde mamifere domestice sau sălbatice. Speciile de mamifere care pot fi infectate continuă să se diversifice pe măsură ce posibilitățile de diagnostic se îmbunătățesc și devin tot mai accesibile. Izolarea recentă de tulpini aviare de la tigri și de la alte feline mari a constituit sursa unui nou scenariu privind transmiterea interspecii și afectarea umană, posibilă prin intermediul pisicilor infectate. Pe de altă parte, s-au precizat și factorii restrictivi care limitează circulația virusurilor gripale interspecii. În decembrie 2003, 2 tigri (*Panthera tigris*) și 2 leoparzi (*Panthera pardus*) au murit în urma infecției H5N1 într-o grădină zoologică din Thailanda. O altă epizootie la felide sălbatice mari a afectat în Thailanda: 418 tigri din care 147 au murit. Aceste evenimente au semnalat două noi aspecte: rolul pe care infecția H5N1 l-ar putea avea în extincția unor specii vulnerabile și rolul acestor specii în transmiterea virusului în natură. Transportul ilicit de păsări valoroase (șoimi, vulturi, papagali etc.) a fost exemplificat de un episod descoperit pe aeroportul din Bruxelles în octombrie 2004. Un thailandez a transportat doi pui de șoim într-un

Păsări sălbatice acvatice
TULPINI LPAI

REZERVOR NATURAL
Păsări sălbatice acvatice și
terestre

TULPINI HPAL
FĂRĂ REZERVOR
NATURAL

Păsări migratoare

DISEMINARE GEOGRAFICĂ

INFECȚIA ALTOR MAMIFERE

PĂSĂRI DOMESTICE INFECTATE HPAI

INFECȚIE UMANĂ INCIDENTALĂ

TRANSMITERE
INTERUMANĂ
OCAZIONALĂ

TRANSMITERE SUSTINUTĂ

Fig.18.1. Perpetuarea pandemică a tulpinilor înalt patogene H5N1 (HPAI). Rezervorul natural este reprezentat de păsările sălbatice acvatice (rațe, gâște) infectate asimptomatic cu tulpini slab patogene (LPAI). Aceste tulpini devin HPAI la păsările domestice care sunt crescute fără bariere de contact cu păsările sălbatice. Tulpinile HPAI nu au rezervor natural însă se pot răspândi geografic datorită păsărilor migratoare și pot infecta diferite specii aviare și de mamifere, omul, inclusiv. Cel puțin trei etape se descriu la om până la potențialul pandemic real: transmitere pasăre → om; transmitere om → om incidentală; transmitere om → om susținută. Survenit la *Phoca vitulina* pe coasta de Est a Statelor Unite cu o mortalitate în jur de 20%.

Subtipurile aviare H1, H3, N1, N2, și N7 au fost izolate de la porci atât în Europa, cât și în Asia sau America. Uneori aceste tulpini au determinat adevărate epizootii. Porcul poate fi infectat simultan cu tulpini aviare sau umane, constituind gazda intermediară cel mai frecvent suspectată a genera tulpini reasortante cu potențial epidemic uman.

Specificitatea pentru receptori a virusurilor aviare se modifică după pasaje la porc în sensul achiziției capacității de recunoaștere a receptorilor umani. Porcul prezintă în epiteliul traheobronșic celule cu receptorii NeuAc 2,6Gal - umani, și NeuAc 2,3Gal - aviari, constituind și prin acest mecanism un suport pentru "umanizarea" tulpinilor aviare.

Infecția gripală cu tulpini porcine este asimptomatică sau blândă la porc și la om. Totuși, condițiile moderne de creștere a porcilor, aglomerarea și introducerea frecventă de animale tinere susceptibile pot genera tulpini virulente, reprezentând un risc profesional pentru îngrijitori și pentru veterinari.

Transmiterea tulpinilor de gripă aviară la mamiferele marine este un alt exemplu de transgresare a barierei de specie. În 1979-80, o epizootie de proporții a survenit la *Phoca vitulina* pe coasta de Est a Statelor Unite, cu o mortalitate în jur de 20%.

CLINICA INFECȚIEI UMANE CU TULPINI AVIARE

Gripa aviară cu tulpini înalt patogene (HPAI) la om are debutul mai puțin abrupt decât gripa cu tulpini umane, simptomele instalându-se treptat pe parcursul primelor zile: febră, frisoane, dureri musculare, dureri de cap, coriză, faringită, tuse.

Perioada de incubație la om variază între 2-5 zile, dacă sursa este reprezentată de păsările bolnave, sau mai lungă, dacă sursa este o persoană infectată cu tulpini aviare (rarissime cazuri secundare). Aproape o treime din cazuri prezintă pe lângă simptome respiratorii și diaree, sugerând evoluția sistemică a infecției. Evoluția depinde de tratament și de vârsta subiectului. Majoritatea cazurilor raportate au survenit la persoane tinere, sub 20 de ani. Frecvent, la copil, evoluția este gravă, chiar letală (depășind 64%). Pneumonia bacteriană complică evoluția nu numai la bătrâni. Mortalitatea la bătrâni a fost în unele serii de 80%, majoritatea prin insuficiență respiratorie acută.

Recrearea tulpinii pandemice 1918 a permis semnalarea similitudinilor genomice și fenotipice și reconsiderarea potențialului iminent pandemic al tulpinilor aviare recente HPAI, care s-ar putea transmite direct la om, fără intermediul unor reasortanți (tabelul 18.II).

TABELUL 18.II

COMPARAREA TULPINEI PANDEMICE 1918 ȘI A TULPINILOR H5N1 IZOLATE ÎN 2003-2005

Criteriu	Tulpini umane H1N1/1918	Tulpini aviare H5N1/2004
Interval de evoluție	1917-1957	1997 → 2005 → ?
Areal geografic	Global	Asia → Europa de Est → Africa
Mortalitate la om	20%	50%
Decese (nr. cazuri)	30-50 milioane	>100
Vârsta medie la deces	25-35	10-20
Replicare în culturi	Da	Da
Transmisie interumană	Facilă	Posibilă
Analiza moleculară	Gene aviare	Gene aviare
Analiza fenotipică	Virulență la șoarece	Virulență la șoarece plus alți factori de patogenitate

Diagnosticul se pune prin izolarea virusului sau cu truse imunoenzimatic rapide. Serologia are importanță pentru supraveghere. Serologia trebuie confirmată prin izolare sau PCR, eventual cu secvențiere.

Istoricul îmbolnăvirilor umane cu virusurile gripei aviare. Studiul virusurilor gripale aviare a luat amploare în 1997, cu ocazia raportării în Hong Kong a primelor cazuri de transmitere la om a virusului gripei aviare H5N1. Studiile de biologie moleculară și epidemiologie au ajutat la elucidarea factorilor care au favorizat producerea acestui eveniment și au demonstrat că tulpina H5N1 este capabilă să infecteze omul în mod direct, fără adaptare prealabilă la gazdă de tip mamifer.

Primele cazuri de transmitere a virusului H5N1 la om au fost puse pe seama epidemiilor apărute în crescătoriile de păsări (Subbarao et al., 1998). În 1997, în Hong Kong, 17 din totalul de 18 cazuri confirmate de infecție umană s-au datorat contactului cu păsările infectate din piețele de animale vii. Simptomatologia a variat de la probleme respiratorii minore, până la manifestări mai grave, cum ar fi pneumonie, insuficiență respiratorie severă. O treime din totalul îmbolnăvirilor au fost letale. Cele 6 decese care s-au produs în Hong Kong au survenit ca urmare a problemelor respiratorii datorate pneumoniei virale. Sacrificarea în numai 3 zile a tuturor păsărilor din crescătoriile contaminate, în total 1,5 milioane, a împiedicat declanșarea unei pandemii.

Organizația Mondială a Sănătății prezintă periodic rapoarte asupra numărului total de cazuri de infecție umană provocată de

virusul H5N1. Datele sunt structurate în funcție de perioadele și zonele de izbucnire a epidemiei, începând din decembrie 2003. Majoritatea îmbolnăvirilor au fost înregistrate în Vietnam (tabelul 18.III).

TABELUL 18.III

**NUMĂRUL CUMULAT AL CAZURILOR DE GRIPĂ AVIARĂ A/(H5N1)
CONFIRMATE LA OM***

Sezonul	Vietnam		Thailanda		Cambodgia		Mortalitate total	
	cazuri	decese	cazuri	decese	cazuri	decese	cazuri/ decese	%
Ian-Iun 04	23	16	12	8	0	0	35/24	68,5
Iul-Dec 04	4	4	5	4	0	0	9/8	88,9
Ian-Iun 04	49	17	0	0	4	4	64/22	34,4
Iul-Dec 05							34/20	58,8
Total	76	37	17	12	4	4	142/74	52,1

*Situția cazurilor de gripă aviară H5N1 la om, raportate până în luna mai 2005 (Sursa: *European Scientific Working Group on Influenza*, iunie 2005).

Epidemiile actuale au o serie de particularități, datorate faptului că în țările afectate peste 80% din păsări sunt crescute în mici ferme rurale sau în gospodării individuale, unde măsurile de oprire a răspândirii epidemiei (carantina, dezinfecția continuă a surselor de apă, a vehiculelor și a persoanelor ce părăsesc fermele, evitarea contactului păsărilor cu insectele sau rozătoarele) sunt dificil de pus în practică. În plus, despăgubirile acordate ulterior sacrificării, în primele două luni, a 100 milioane de păsări, au fost inadecvate, ceea ce a descurajat raportările de noi cazuri. Majoritatea cazurilor de infecție cu H5N1 la om s-au produs, probabil, datorită contactului direct cu animalele vii sau moarte. S-au raportat ocazional și cazuri de transmitere de la om la om în timpul epidemiei din Hong Kong în 1997, din Thailanda în 2004 și nu ar putea fi exclus nici în Cambodgia și Vietnam.

MONITORIZAREA IZOLATELOR DE A/H5N1 ÎNTÂLNITE LA OM

Este esențial ca izolatele umane și cele aviare să fie comparate pentru a se determina dacă variantele întâlnite la om încep să prezinte modificări antigenice majore față de virusurile de la păsări ("antigenic drift"). Această ultimă caracteristică este de mare importanță, pentru că indică riscul transmiterii interumane a noilor variante antigenice. Tulpina de gripă aviară A/H5N1 poate suferi rapid și relativ

ușor modificări genetice prin mutații și recombinări. Reasortarea genelor între tulpini gripale umane și aviare, care ar fi facilitată de faptul că genomul acestor agenți infecțioși este segmentat, s-ar putea produce în cursul unor coinfecții.

Izolatele din 2004 obținute de la oameni cu infecții respiratorii severe s-au dovedit a fi similare cu cele aviare din aceeași țară, atât din punct de vedere genetic, cât și antigenic. Genele pentru hemaglutinină ale virusurilor izolate de la oameni în Vietnam, în primele 3 luni ale lui 2005, au prezentat însă modificări în secvența de aminoacizi față de virusurile întâlnite în 2004. Cel mai frecvent, modificările se observă în zona de legare cu receptorul celular, putând influența tropismul de specie.

Analizele filogenetice ale variantelor de A/H5N1 întâlnite la om și ale unor izolate aviare din intervalul 2004-2005 au arătat că virusurile din nordul Vietnamului și Thailanda au tendința să se departajeze într-un grup separat față de cele din sudul Vietnamului și Cambodgia. În ciuda diferențelor apărute între tulpinile H5N1 umane și a trendului de separare în grupuri diferite a virusurilor din Nordul și Sudul Vietnamului, nu există dovezi concrete care să ateste că aceste fenomene au fost însoțite de modificări în virulență sau în tropismul de specie.

INFECȚII INTERUMANE CU TULPINI H5N1

În accepțiunea OMS, stadiile definirii pericolului pandemic gripal se sistematizează astfel:

- *faza interpandemică:*

- I. risc absent: fără identificarea unor subtipuri gripale noi la om;
- II. noi subtipuri gripale circulă la animale, potențial risc uman;

- *faza de alertă pandemică:*

- III. apar infecții umane cu subtipuri noi; fără transmitere interumană;

- IV. mici focare localizate de transmitere interumană cu noul subtip;

- V. focare mari, sugerând adaptarea noului subtip la om;

- *faza pandemică:*

- VI. transmitere interumană susținută în populație = pandemie.

Apariția cazurilor de transmitere interumană pune problema ridicării gradului de alertă la stadiul IV, ceea ce nu a fost cazul până în prezent, în ciuda cazurilor izolate descrise în Vietnam sau, recent, în Indonezia.

Foarte puține cazuri de transmitere interumană, nesusținută dincolo de cazuri secundare, au fost confirmate. Într-un caz, transmiterea a survenit la mama care a îngrijit un copil bolnav în zilele care au precedat decesul acestuia. Mai mult, una dintre mătuși, care a asis-

tat copilul și mama bolnavă, s-a îmbolnăvit și ea. Incubația cazurilor secundare a variat între 4-10 zile, iar durata evoluției până la deces, în primele două cazuri, a fost de 6-10 zile. În Indonezia, în aprilie 2006, a fost investigat un focar care a cuprins 7 cazuri de infecție H5N1 cu 6 decese. Cazul index a fost la o femeie care a avut contact limitat cu păsări probabil infectate: debutul bolii la 29 aprilie, decesul la 4 mai. Un nepot cu care a venit în contact a decedat în 13 mai, iar tatăl acestuia în 22 mai. Este pentru prima oară când este descris un lanț de transmitere interumană a virusului H5N1 care cuprinde și cazuri terțiare. Acest episod traduce adaptarea crescândă a virusului H5N1 la om, însă analiza moleculară nu a identificat modificări genomice în raport cu izolatele anterioare, determinând specialiștii să nu opteze pentru ridicarea gradului de alertă prepandemică la stadiul IV.

În 2006, cazurile umane apărute în Turcia, Irak, Azerbaidjan au prezentat ca particularitate infecția consecutivă a mai multor membri ai acelorași familii. Cum datele de secvențiere ale izolatelor întârzie, nu se poate afirma că s-au produs mutații care să faciliteze transmiterea interumană. O altă explicație ar putea fi susceptibilitatea mare, genetic determinată, a subiecților din aceeași familie (fig. 18.2).

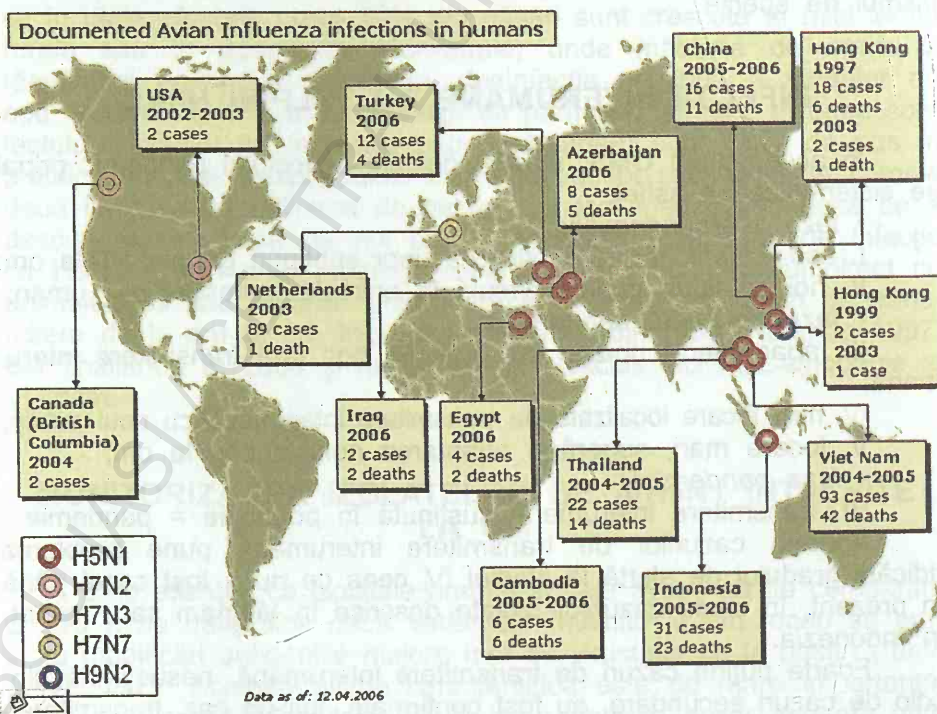


Fig. 18.2. Diseminarea cazurilor de infecții umane cu tulpini aviare H5N1 sau H7N? în Europa, 2006 și în restul lumii (1997-2006) după <http://europa.eu.int/health>.

MĂSURI DE PREVENIRE A UNEI PANDEMII

Dacă luăm în considerare șansele ca virusul A/H5N1 să provoace o pandemie, două dintre cele trei condiții necesare au fost realizate: noutatea antigenică a virusului, capabil de a se replica și a determina boala la om și lipsa imunității în populația umană. Cea de-a treia condiție reclamă facilitatea transmiterii interumane a noilor tulpini. Probabilitatea înregistrării unor episoade epidemice și chiar pericolul unei pandemii nu poate fi ignorat. În acest sens, au fost stabilite o serie de măsuri de prevenire a transmiterii, de care ar trebui să se țină cont în toate zonele afectate de gripa aviară:

- eliminarea rezervorului aviar de virus (dectecția păsărilor bolnave, carantinarea și sacrificarea lor de necesitate);
- asigurarea echipamentului de protecție pentru îngrijitori, veterinari și personalul implicat în sacrificarea păsărilor;
- monitorizarea virusurilor gripale izolate, pentru a stabili potențialul de mutații sau reasortare a tulpinii H5N1; toate variantele antigenice nou apărute trebuie studiate prin comparație cu cele vechi;
- dectecția timpurie, raportarea și investigarea eventualelor focare de cazuri umane;
- limitarea transmiterii umane prin stabilirea rapidă a măsurilor de izolare, supravegherea contactilor, tratament profilactic antiviral și instituirea unor restricții în transportul internațional;
- eră (în special a persoanelor care vin în contact cu animalele susceptibile la infecție) pentru prevenirea apariției recombinanților între tulpinile umane și cele aviare;
- producerea unor tulpini vaccinale de H5N1 imunogene și accesibile producătorilor.

Măsurile generale de promovare a stării de sănătate sunt foarte importante în limitarea diseminării infecției gripale. Aceste măsuri pot fi împărțite în:

- adaptarea comportamentului individual și al stilului de viață;
- ameliorarea condițiilor de viață și muncă;
- ameliorarea condițiilor de mediu natural;
- îmbunătățirea indicilor socio-economici;
- creșterea accesului la serviciile medicale.

Comportamentul individual este dependent de educație, cultură, venit, relații sociale etc. Fiecare din acești factori contribuie la calitatea vieții. Condițiile de viață și muncă sunt determinante pentru statusul economic. Oamenii săraci și puțin educați au o sănătate precară și sunt mai vulnerabili în caz de pandemie gripală. Gospodăriile în care coabitarea om - animale este vitală ca mijloc de existență sunt surse potențiale pentru noi tulpini gripale care pot traversa bariera de specie. Deși omul nu este susceptibil la virusurile gripei aviare, expunerea continuă la concentrații mari de virus poate facilita infecția umană.

Mediul natural este un ecosistem sensibil la acțiunile proprii sau improprii ale comunității. Poluarea, frigul, umezeala, expunerea la soare afectează morbiditatea și mortalitatea prin afecțiuni respiratorii acute.

MONITORIZAREA BOLNAVILOR INFECTAȚI CU VIRUSUL H5N1

OMS a publicat recomandări pentru managementul pacienților infectați cu virusul gripei aviare. Obiectivele măsurilor de control au ca scop:

- Izolarea imediată a cazurilor pentru prevenirea transmisiei nosocomiale a infecției.

- Îngrijirea pacienților în spital pentru prevenirea deceselor.

- Identificarea contactilor și oferirea de medicamente antivirale.

Controlul și prevenirea transmisiei nosocomiale începe cu considerarea infecției gripale H5N1 în diagnosticul diferențial al oricărei infecții respiratorii acute severe. Anamneza trebuie condusă pentru a detecta un posibil contact cu păsări bolnave sau cu mediul contaminat. Practicile corecte pentru prevenirea transmisiei aerogene sau prin contact valabile în toată patologia infecțioasă vor fi atent supravegheate. Pacienții vor fi izolați singuri în cameră (cu presiune negativă dacă este posibil) sau, în cazuri extreme, în rezerve mici, cu perdele de protecție între paturi. Personalul de îngrijire va fi redus la maxim și va fi instruit pentru purtarea echipamentului de protecție, inclusiv măști de înaltă eficiență (sau cel puțin măști chirurgicale), halate, mănuși, viziere etc. Regulile de igienă obișnuite trebuie atent urmărite, în special în procesarea deșeurilor. Personalul de îngrijire va fi monitorizat clinic de două ori pe zi (febră, tuse etc.) și va primi medicație antivirală. Toate echipamentele folosite vor fi procesate ca deșeuri cu biohazard maxim, sterilizate sau incinerate.

Bolnavii vor primi cât de timpuriu posibil oseltamvir (75 mg x 2, zilnic, cel puțin 5 zile). Vor fi monitorizați în privința apariției infecțiilor bacteriene și vor primi tratamentul cu antibiotice adecvat, de preferință intravenos. Se vor asigura medicamente simptomatice și posibilitatea oxigenoterapiei. Se vor evita ca antitermice salicilații și aspirina, recurgându-se la paracetamol sau ibuprofen. Nu se va recurge la amantadină sau ribavirină. Cortizonul se va administra ca ultimă resursă. Pacientul va rămâne izolat 7 zile după rezoluție (21 de zile în cazul copiilor). La fel, monitorizarea activă a contactilor (febră, tuse, diaree etc.) se va extinde pentru cel puțin 7 zile.

EFFECTUL MEDICAMENTELOR ANTIVIRALE ASUPRA TULPINILOR AVIARE

Încă din 1998 s-a semnalat rezistența tulpinilor H5N1 aviare la amantadină, iar substratul molecular al rezistenței a fost explicat prin mutații în proteina M2. Mai recent s-a constatat achiziția rapidă a rezistenței la oseltamvir. O singură substituție a histidinei cu tirozina - H274Y - în secvența neuraminidazei este la originea lipsei de activitate a unor doze de zeci de ori mai mari. Semnificativ, tulpina rezistentă a fost izolată de la un caz care primise trei zile doza profilactică (mai redusă) de oseltamvir. Studiul mai multor clone ale tulpinii rezistente au sugerat o afinitate mai mare de legare a receptorului sialil de tip uman decât a celui aviar. Dacă tratamentul cu oseltamvir poate contribui la selecția unor tulpini aviare cu tropism uman rămâne de demonstrat.

Apariția rezistenței ridică semne de întrebare în privința oportunității stabilirii unor stocuri de oseltamvir care ar putea fi utilizate în eventualitatea unei pandemii umane cu tulpini H5N1. În Statele Unite au fost alocate peste 3 miliarde dolari pentru stocarea acestui medicament. Cu această sumă se preconizează obținerea dozelor necesare pentru tratamentul a 50% din americani. În România, la scară mai mică, s-au achiziționat și distribuit mii de doze de oseltamvir în județele Tulcea și Brăila pentru focarele de gripă aviară la păsări.

GRIPA AVIARĂ ÎN ROMÂNIA

Identificarea virusului H5N1 în România a fost inițial semnalată în Delta Dunării la începutul lui octombrie 2005. Focarul de la Ceamurlia de Jos a fost notificat în ferme care creșteau împreună găini și rațe. La aproximativ 100 de păsări au fost identificate 36 de păsări moarte. Localitatea se află pe malul lacului Golovița, în apropierea litoralului (Gura Portiței). În săptămâna următoare, alte două focare au fost identificate la Maliuc, pe malul brațului Sulina al Dunării și la Vultur, în interiorul județului Tulcea. Printre păsările moarte la Maliuc au fost peste 500 de lebede. Apropierea acestor localități de zonele inundabile și prezența lebedelor au confirmat suspiciunea că păsările migratoare constituie sursa epizootiei. În noiembrie, alte focare au fost semnalate în județul Tulcea, la Caraorman (pe malul lacului Obretinul Mic), la Crișan și în alte localități, toate în apropiere de Sulina. În afara păsărilor moarte din gospodării au fost găsite mai multe păsări migratoare moarte la care s-a confirmat prezența virusului H5N1. În noiembrie au fost semnalate focare și în județele limitrofe: Brăila, Buzău, Călărași. În localitățile afectate,

păsările erau crescute liber în gospodării, existând toate premisele contactului cu păsările migratoare. Cadavre de păsări migratoare contaminate au fost găsite și la distanță în lunca Prutului, județul Vaslui sau în lunca Dunării și în județul Constanța. Noile focare s-au notificat în comune mari cu multe gospodării și număr mare de păsări.

În decembrie, o parte din primele focare au fost soluționate, dar supravegherea atentă a descoperit alte localități afectate în județele Ialomița și Călărași. Speciile afectate au fost: găini, gâște (*Anser albifrons*), rațe (*Anas platyrhynchos*), cormorani (*Phalacrocorax carbo*), pescăruși (*Larus canus*) etc. Majoritatea comunelor afectate sunt înconjurate de lacuri și bălți, iar creșterea păsărilor este o sursă importantă de hrană, mai ales iarna. Afluxul de păsări migratoare (probabil contaminate) a fost facilitat de întârzierea căderii zăpezii și de lipsa măsurilor de control în țările vecine: Moldova și Ucraina. În Ucraina, primele focare au fost semnalate în Republica Autonomă Crimeea abia după 15 decembrie 2005. Activitatea organelor sanitare veterinare a fost suprasolicitată și de evoluția paralelă în unele din județele menționate (Ialomița și Călărași) a unei epizootii de boală Newcastle (fig. 18.3).

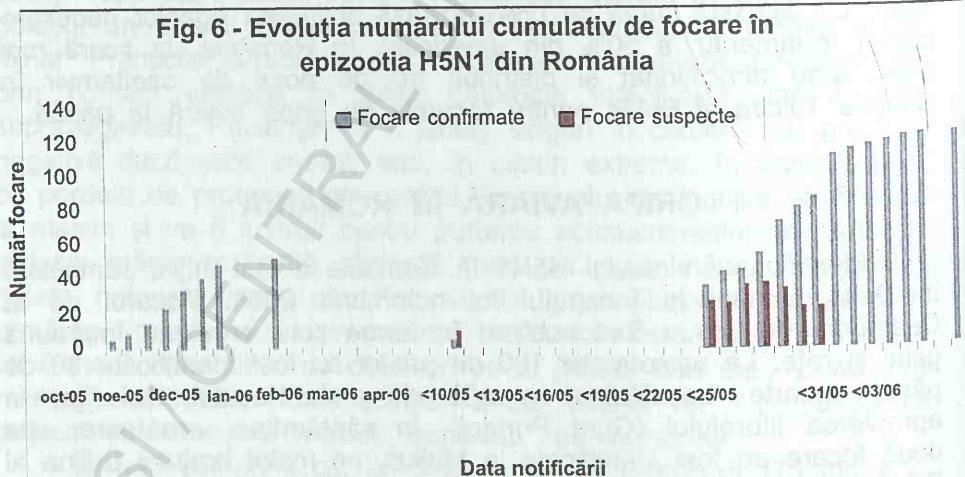


Fig. 18.3. Evoluția numărului cumulativ de focare în epizootia H5N1 din România.

În total, în România, la sfârșitul anului 2005 au fost contabilizate 23 de focare în care s-au luat măsuri atente de control: sacrificarea păsărilor din aceeași gospodărie cu cele infectate, carantinarea localității, interzicerea deplasării păsărilor, triajul epidemiologic, dezinsecția gospodăriilor și a mijloacelor de transport. O campanie susținută de conștientizare a locuitorilor și a personalului medical și vete-

rinar a fost, de asemenea, inițiată. În plus, s-au achiziționat și distribuit mii de doze de vaccin gripal uman sezonier, precum și cantități însemnate de oseltamvir în județele Tulcea și Brăila. Cum era de așteptat, cooperarea cetățenilor nu a fost corespunzătoare încât, în ciuda măsurilor coercitive, a continuat semnalarea de noi focare în aceleași localități sau în altele. În primele 3 luni ale anului 2006 totalul cumulativ a ajuns la 51 de focare, multe în localități urbane (Năvodari, Hârșova, Cernavodă, Medgidia etc.). Impactul economic și social a fost deosebit, afectând unele rute de transport, activitatea unor întreprinderi și școli și determinând cheltuieli de milioane de euro pentru despăgubirile compensatorii sau activitățile de supraveghere și control. Din mai 2006, s-a înregistrat un al doilea val epizootic pornit (probabil) de la ferme contaminate din Codlea, Brașov. Primele cazuri au fost semnalate de persoane private care au procurat păsări de la o fermă care deținea 80 000 de păsări infectate. De aici au fost comercializați, fără control sanitar-veterinar, pui de găină în mai multe județe din centrul țării: Vrancea, Prahova, Sibiu, Mureș, Vâlcea etc. Cele mai afectate județe au fost Brașov și Prahova (dintr-un număr de 16 județe), iar numărul total de focare la începutul lui iunie 2006 (când epizootia s-a stins) a fost de 125. Confirmarea etiologiei H5N1 prin PCR s-a făcut în 15-16 mai, iar sursa întregului episod a fost atribuită comerțului ilicit, deplasării necontrolate a păsărilor, breșelor în controlul sanitar-veterinar. Datele ornitologice nu au semnalat mortalități la păsările sălbatice din zonă. Este probabil că acest al doilea val să fie continuarea primului, iar vectorul întreținerii epizootiei să fie vrăbiile care pot purta virusul asimptomatic. Măsurile întreprinse au fost sacrificarea păsărilor în focare, carantina, controlul deplasării animalelor, filtre de dezinfecție etc.

Precizări asupra termenilor utilizați

Gripă sezonieră - infecție respiratorie acută datorată tulpinilor umane circulante care se transmit endemic sau epidemic de la om la om. Există vaccinuri eficiente, iar un anumit nivel de imunitate colectivă limitează diseminarea.

Gripă aviară - infecție a păsărilor determinată de un virus gripal de tip A care are un index de patogenitate intravenos la puii de găină în vârstă de 6 săptămâni mai mare de 1,2 sau orice infecție a păsărilor sau mamiferelor cu un virus gripal sub-tip A/H5 sau A/H7 pentru care secvențierea HA demonstrează prezența de aminoacizi bazici la situl de clivare. Vaccinarea păsărilor este condiționat acceptată în Uniunea Europeană.

Gripă pandemică - epidemie cu diseminare geografică globală sau regională severă, cu evoluție clinică gravă, pentru care populația este virgină imunologic. Vaccinul nu este disponibil iar eventuala lui eficiență este imprevizibilă.

Rată de atac - procentajul populației care se îmbolnăvește în epidemii/pandemii.

Gripă din punct de vedere al sănătății publice - afecțiune respiratorie acută în cursul sezonului epidemic/pandemic care determină un impact economic; de exemplu: o zi de muncă absentă sau o consultație medicală.

B.C.U. M. EMINESCU "IASI"

păsările erau crescute liber în gospodării, existând toate premisele contactului cu păsările migratoare. Cadavre de păsări migratoare contaminate au fost găsite și la distanță în lunca Prutului, județul Vaslui sau în lunca Dunării și în județul Constanța. Noile focare s-au notificat în comune mari cu multe gospodării și număr mare de păsări.

În decembrie, o parte din primele focare au fost soluționate, dar supravegherea atentă a descoperit alte localități afectate în județele Ialomița și Călărași. Speciile afectate au fost: găini, gâște (*Anser albifrons*), rațe (*Anas platyrhynchos*), cormorani (*Phalacrocorax carbo*), pescăruși (*Larus canus*) etc. Majoritatea comunelor afectate sunt înconjurate de lacuri și bălți, iar creșterea păsărilor este o sursă importantă de hrană, mai ales iarna. Afluxul de păsări migratoare (probabil contaminate) a fost facilitat de întârzierea căderii zăpezii și de lipsa măsurilor de control în țările vecine: Moldova și Ucraina. În Ucraina, primele focare au fost semnalate în Republica Autonomă Crimeea abia după 15 decembrie 2005. Activitatea organelor sanitare veterinare a fost suprasolicitată și de evoluția paralelă în unele din județele menționate (Ialomița și Călărași) a unei epizootii de boală NewCastle (fig. 18.3).

Fig. 6 - Evoluția numărului cumulativ de focare în epizootia H5N1 din România

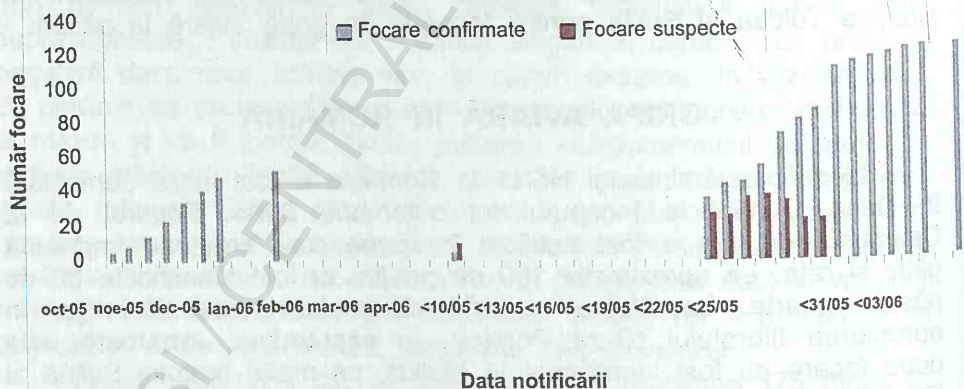


Fig. 18.3. Evoluția numărului cumulativ de focare în epizootia H5N1 din România.

În total, în România, la sfârșitul anului 2005 au fost contabilizate 23 de focare în care s-au luat măsuri atente de control: sacrificarea păsărilor din aceeași gospodărie cu cele infectate, carantinarea localității, interzicerea deplasării păsărilor, triajul epidemiologic, dezinfectia gospodăriilor și a mijloacelor de transport. O campanie susținută de conștientizare a locuitorilor și a personalului medical și vete-

riar a fost, de asemenea, inițiată. În plus, s-au achiziționat și distribuit mii de doze de vaccin gripal uman sezonier, precum și cantități însemnate de oseltamvir în județele Tulcea și Brăila. Cum era de așteptat, cooperarea cetățenilor nu a fost corespunzătoare încât, în ciuda măsurilor coercitive, a continuat semnalarea de noi focare în aceleași localități sau în altele. În primele 3 luni ale anului 2006 totalul cumulativ a ajuns la 51 de focare, multe în localități urbane (Năvodari, Hârșova, Cernavodă, Medgidia etc.). Impactul economic și social a fost deosebit, afectând unele rute de transport, activitatea unor întreprinderi și școli și determinând cheltuieli de milioane de euro pentru despăgubirile compensatorii sau activitățile de supraveghere și control. Din mai 2006, s-a înregistrat un al doilea val epizootic pornit (probabil) de la ferme contaminate din Codlea, Brașov. Primele cazuri au fost semnalate de persoane private care au procurat păsări de la o fermă care deținea 80 000 de păsări infectate. De aici au fost comercializate, fără control sanitar-veterinar, pui de găină în mai multe județe din centrul țării: Vrancea, Prahova, Sibiu, Mureș, Vâlcea etc. Cele mai afectate județe au fost Brașov și Prahova (dintr-un număr de 16 județe), iar numărul total de focare la începutul lui iunie 2006 (când epizootia s-a stins) a fost de 125. Confirmarea etiologiei H5N1 prin PCR s-a făcut în 15-16 mai, iar sursa întregului episod a fost atribuită comerțului ilicit, deplasării necontrolate a păsărilor, breșelor în controlul sanitar-veterinar. Datele ornitologice nu au semnalat mortalități la păsările sălbatice din zonă. Este probabil că acest al doilea val să fie continuarea primului, iar vectorul întinerii epizootiei să fie vrăbiile care pot purta virusul asimptomatic. Măsurile întreprinse au fost sacrificarea păsărilor în focare, carantina, controlul deplasării animalelor, filtre de dezinfecție etc.

Precizări asupra termenilor utilizați

Gripă sezonieră - infecție respiratorie acută datorată tulpinilor umane circulante care se transmit endemic sau epidemic de la om la om. Există vaccinuri eficiente, iar un anumit nivel de imunitate colectivă limitează diseminarea.

Gripă aviară - infecție a păsărilor determinată de un virus gripal de tip A care are un index de patogenitate intravenos la pui de găină în vârstă de 6 săptămâni mai mare de 1,2 sau orice infecție a păsărilor sau mamiferelor cu un virus gripal subtip A/H5 sau A/H7 pentru care secvențierea HA demonstrează prezența de aminoacizi bazici la situl de clivare. Vaccinarea păsărilor este condiționat acceptată în Uniunea Europeană.

Gripă pandemică - epidemie cu diseminare geografică globală sau regională severă, cu evoluție clinică gravă, pentru care populația este virgină imunologic. Vaccinul nu este disponibil iar eventuala lui eficiență este imprevizibilă.

Rată de atac - procentajul populației care se îmbolnăvește în epidemii/pandemii.

Gripă din punct de vedere al sănătății publice - afecțiune respiratorie acută în cursul sezonului epidemic/pandemic care determină un impact economic; de exemplu: o zi de muncă absentă sau o consultație medicală.

Pierderile economice au fost imense, fiind sacrificate 500 000 de păsări iar exportul interzis. Din fericire, nu au fost confirmate infecții umane.

Concluzii

Adaptarea unor tulpini gripale aviare la o nouă specie este un proces complex care depinde de co-evoluția celor doi parteneri: virus și gazdă. Experiența arată că virusurile gripale aviare pot traversa sporadic bariera de specie, adaptându-se la gazde noi (canine, feline, om etc.). În cele mai multe cazuri de transmitere la om, fenomenul este de tip fund de sac (*dead-end*), în sensul imposibilității diseminării interumane. Teoretic, virusurile gripale de la animale pot depăși obstacolele adaptării la om, realizând o suită de modificări adaptative care să permită pe rând: creșterea afinității pentru receptorii umani, activarea cu asistența unor enzime proteolitice umane, eludarea factorilor inhibitori de tipul interferonului uman, asigurarea competenței replicative la nivel înalt la om. Realizarea tuturor secvențelor acestei suite rămâne însă o posibilitate extrem de limitată, dacă nu improbabilă.

BIBLIOGRAFIE

- Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. Arch. Virol. 1991;119:37-42.
- Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. J. Infect. Dis. 2002;185:1005.
- Bridges CB, Katz JM, Seto WH et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J. Infect. Dis. 2000;181:344-48.
- Bush RM., Bender CA. Subbarao K, Cox NJ, Fitch WM. Predicting the Evolution of Human Influenza A. Science 1999;286:1921-1925.
- Chen H, Smith GJD. H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. Nature 2005;436:191.

CAPITOLUL 19

PARAMIXOVIRIDAE

De reținut:

Virioni pleomorfi, mai mari decât orthomixoviridele.

Genom: ARNss nesegmentat, cu polaritate negativă.

Proprietăți importante: grup larg de agenți infecțioși care determină îmbolnăviri acute respiratorii sau sistemice la om, mamifere, păsări. Aplicarea vaccinurilor vii atenuate în rujeolă și oreion a scăzut incidența bolilor și a complicațiilor lor. Virusul respirator sincițial (VRS) și parainfluenza 3 continuă să reprezinte probleme pentru pediatri, fiind cunoscută gravitatea infecțiilor, mai ales în primele 3 luni de viață. Metapneumovirusul uman determină coinfecții respiratorii cu VRS, care au o evoluție severă.

Istoric. Agenții incluși în această familie au spectru de gazdă extins de la păsări la om. Din punct de vedere evolutiv, boli precum rujeola, oreionul sunt viroze recente ale omului, preluate de la animalele domestice. Omul preistoric, trăind în aglomerări mici și dispersate, nu putea asigura menținerea ciclului epidemiologic al unor viroze monotipice, urmate de o imunitate persistentă, care exclude foștii bolnavi din lanțul epidemiologic. Omul modern, trăind în colectivități dense, furnizează cu fiecare nouă generație contingente de subiecți susceptibil. Totuși, noile vaccinuri (antirujeolos, antiurlian) promit într-un viitor apropiat (2005-2010) eradicarea acestor viroze. Vaccinurile împotriva virozelor sistemice determinate de paramixovirusuri au o eficiență remarcabilă, contrastând cu dificultățile profilaxiei specifice a virozelor respiratorii (cu virus respirator sincițial, de exemplu).

CLASIFICARE

Familia paramixoviridae cuprinde două subfamilii și cinci genuri asemănătoare structural dar cu antigenitate distinctă (fig.19.1). Diferențele structurale între ortho- și paramixovirusuri sunt sintetizate în tabelul 19.1.

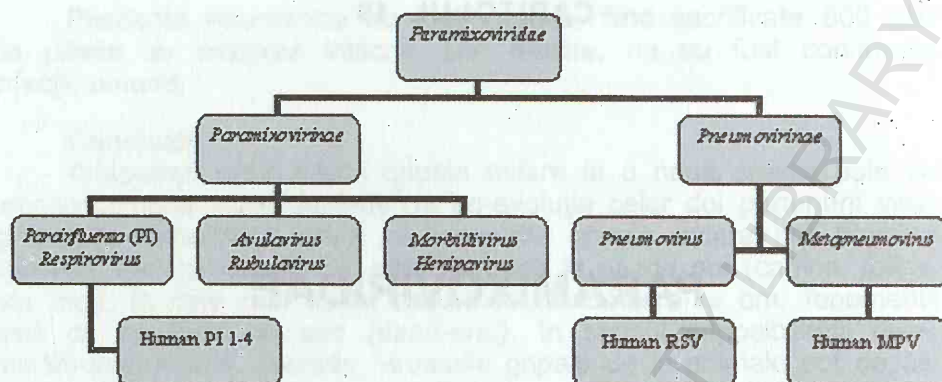


Fig. 19.1. Clasificarea familiei paramixoviridae.

TABELUL 19.1

DEOSEBIRI ÎNTRE ORTHO- ȘI PARAMIXOVIRUSURI

Caracteristica	Orthomixovirusuri	Paramixovirusuri
Genomul	Segmentat	Întreg
Internalizarea	Prin endocitoză	Prin fuziune
Decapsidarea	Dependentă de pH acid	Independentă de pH
Sinteza virionilor progeni	În nucleu	În citosol
Acțiunea actinomicinei D	Inhibă replicarea	Nu inhibă replicarea
Primeri pentru replicare	Flexibili	Regula celor 6 nt
Variabilitatea antigenică	Mare	Restrânsă
Neuraminidaza proteină separată	Da	Nu

Cinci genuri din familia paramixoviridae au importanță în medicina umană:

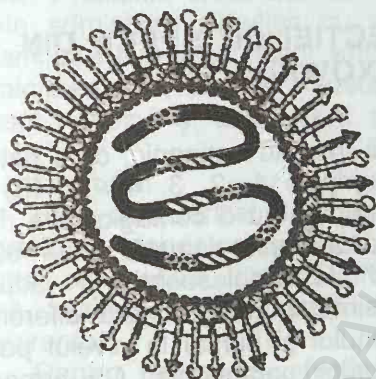
- Respiravirus - care cuprinde virusurile parainfluenza 1, 2, 3, și 4. Un alt virus inclus în acest gen este virusul bolii NewCastle, patogen la păsări, ocazional, agent al unor conjunctivite la om.
- Pneumovirus cu specia prototip - virusul respirator sincițial (VRS).
- Metapneumovirus (hu-MPV).
- Morbillivirus cu specia prototip - virusul rujeolos.
- Rubulavirus include virusul urlian (al oreionului sau parotiditei epidemice).

Rememorarea deosebirilor ortho- paramixovirusuri este importantă din punct de vedere diagnostic și clinic. Simptomatologia infecțiilor cu specii ale genului pneumovirus se suprapune cu cea a infecțiilor gripale. Infecțiile cu virusul respirator sincițial (VRS) sunt responsabile de cea mai mare parte a pneumoniilor la copiii sub un an,

iar infecțiile cu metapneumovirusuri determină frecvent bronșiolite, pneumonii sau exacerbări ale astmului la grupa de vârstă 5-15 ani. Aceste virusuri și paramixovirusurile 1-3 sunt evidențiate pe probele recoltate de la bolnavii cu "influenza-like illness".

MORFOLOGIA VIRIONILOR ȘI PARTICULARITĂȚI FUNCȚIONALE

Virionii au aspect pleomorf, dar predominant sferic. Sunt frecvente formele multiplioide care încorporează două sau mai multe nucleocapside în aceeași anvelopă sau, dimpotrivă, formele goale - anvelopă fără nucleocapsidă (fig. 19.2).



Paramyxovirus
Diagram of virion section (taken from ICTV guidelines)

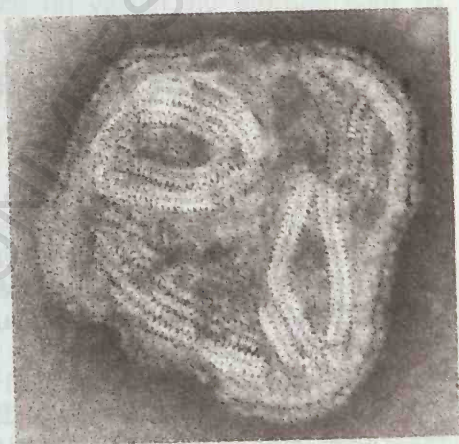


Fig.19.2. Schița virionului la paramixovirusuri și imagine electronoptică a virusului rujeolos. Caracteristică este imaginea NC în «coloană vertebrală de pește», conținând genomul nesegmentat.

Organizarea genomului ARNss(-) este asemănătoare la toate paramixovirusurile, expunând următoarea succesiune de gene: 3'-NC-P-M-F-M2-SH-G-L-5', unde N = nucleoproteină, M = proteină matrix, F = proteină de fuziune etc. Aceste gene sunt utilizate și pentru diagnosticul infecției prin amplificare genică (RT-PCR).

Virionul paramixovirusurilor cuprinde o ribonucleoproteină helicoidală (nucleocapsida - **NC**) și o anvelopă externă. NC conține genomul ARNss cu polaritate negativă (antimesaj). Pe această matriță transcriptaza virală inițiază transcrierea unui ARNm lung policistronic, care ulterior este clivat. Anvelopa conține lipide derivate din membrana celulei gazdă, care formează o pătură bistratificată în care sunt implantate proiecțiile anvelopei. Există 2 sau 3 feluri de proiecții - glicoproteine virus codificate, esențiale în evoluția infecției:

HA/NA - cu activitate hemaglutinantă și neuraminidazică (ultima numai la genul paramixovirus).

FF - sau factorul de fuziune, cu activitate sincițizantă și în inițierea penetrării virale prin fuziunea anvelopei cu membrana celulei gazdă.

Internalizarea prin fuziune diferențiază para- de orthomixovirusuri. Constanța unor domenii din structura primară a lanțului de aminoacizi ai FF la multe virusuri (paramixo, rhabdo, lenti) pare a avea implicații patogene în unele infecții cronice. Factorul de fuziune este implicat și în sincițizare. Efectul citopatic tipic pentru paramixoviridae cuprinde formarea de sinciții, dar și de incluzii intranucleare și intracitoplasmice.

ASPECTE CLINICE ALE INFECȚIEI CU SPECII DIN GENUL PARAMIXOVIRUS

Genul paramixovirus conține specii înrudite antigenic, care determină infecții respiratorii (virusurile paragripale 1, 2, 3, 4A și 4B) și sistemice (virusul urlian). Virusurile paragripale au o contagiozitate ridicată, determinând frecvent infecția copilului mic; virusul urlian este moderat contagios, boala survenind la adolescenți și adulți. Aproximativ 30-50% din infecții sunt asimptomatice. O altă diferență este dată de evoluția sistemică a oreionului și numai la nivelul porții de intrare (respiratorie) în cazul virusurilor paragripale. Ca urmare, imunitatea după oreion este de durată și protectoare; după infecțiile paragripale imunitatea este pasageră, cu reinfecții frecvente.

Infecțiile paragripale evoluează distinct la copii și la adulți. Corize, faringite și exacerbări ale bronșitelor cronice se întâlnesc la adulți; la sugari laringotraheitele obstructive (crup) și pneumoniile interstițiale sunt manifestările cele mai frecvente. Incubația variază între 3-6 zile, iar evoluția este sub o săptămână. Frecvența infecțiilor asimptomatice trece de 50%, iar manifestările obstructive la sugari survin o dată la 30-40 de copii infectați.

Virusurile paragripal 1 și 2 nu au o incidență sezonieră, iar semnificația lor clinică este evidentă mai ales la sugari, unde au o pondere similară virusului respirator sincițial în etiologia crupului.

Virusul paragripal 3 este cel mai contagios și cel mai devreme transmis (chiar la copiii sub 6 luni). Este singurul care, în colectivități, determină manifestări epidemice. 50% din copiii în vârstă de 1-2 ani au anticorpi, iar la 4-6 ani peste 90% sunt seropozitivi anti-paragripal 3.

Virusul paragripal 3 bovin este un patogen important al vițelilor, la care provoacă o pneumonie exsudativă extensivă în cadrul unui

sindrom epidemic numit *shipping fever*. Acest agent a fost utilizat în încercări de imunizări heteroloage la copil.

Virusurile paragripale 4A și 4B sunt dificil de izolat și, de aceea, ponderea infecțiilor respiratorii pe care le determină este apreciată ca minimă. Tipul 4A dă reacții încrucișate cu virusul urlian.

Virusul urlian are toate caracterele structurale și biologice ale paramixovirusurilor: are activitate hemaglutinantă, hemolitică și neuraminidazică, infectivitate termolabilă, stabilitate antigenică, pleomorfism structural.

Virusul urlian determină o viroză mai frecventă la adolescenți - oreionul sau parotidita epidemică. Boala excelează prin numărul mare de infecții inaparente însă, la adolescenții după pubertate, poate evolua mai grav, cu următoarele complicații: meningită, pancreatită, orhită. Profilaxia oreionului se face cu un vaccin viu atenuat care se poate administra simultan cu vaccinul rujeolos și rubeolos. În genul paramixovirus există relații antigenice între virusul urlian și virusurile parainfluenza 1, 2 și 3. Virusurile parainfluenza sunt hemadsorbante, virusul rujeolos și urlian sunt și hemaglutinante.

Oreionul

Este caracterizat de inflamarea nesupurativă (de multe ori unilaterală) a glandelor parotide. Alte organe afectate sunt: testiculul, ovarul, pancreasul, tiroida, SNC. Diseminarea oreionului este aerogenă, incubajia relativ lungă, 18-21 de zile; 20-40% din infecții sunt inaparente.

Pentru patogenia infecției au fost propuse două teorii, ambele ținând seamă de realitatea viremiei. Într-o primă alternativă, multiplicarea primară este cantonată în celulele acinare ale parotidei, după care urmează viremia și localizarea eventuală în alte organe. În cealaltă interpretare, inițial virusul se replică în tractul respirator superior iar, în urma viremiei, parotidele sunt afectate odată cu celelalte organe.

Parotidita urliană este benignă la copil. După pubertate și la adulți complicațiile o fac redutabilă.

Epidemiologic vorbind, oreionul este o afecțiune comună, asemănătoare rujeolei, în care vaccinarea este oportună. Sunt câteva diferențe în raport cu rujeola: incubajia mai lungă, forme inaparente frecvente (în special sub 3 ani), contagiozitatea mai mică.

O observație importantă privind procesul de atenuare al tuturor paramixovirusurilor ține de evidențierea rolului celulei gazdă și al temperaturii de incubare. În general, tulpinile atenuate (de oreion, rujeolă, para 3) sunt variante cultivate la temperaturi suboptimale și pe substraturi celulare filogenetic depărtate (pasăre) de gazda umană. Atenuarea ține de rolul glicoproteinelor anvelopei virale în replicare. Aceste glicoproteine sunt sintetizate ca precursori, care devin funcțio-

nali numai după clivajul proteolitic efectuat de proteaze din substratul celular. Prin adaptarea tulpinilor atenuate prin pasaje seriate pe celule de pasăre, glicoproteinele nu mai sunt clivate de proteazele umane, sunt nefuncționale, iar inițierea replicării virale este întârziată.

VIRUSUL RESPIRATOR SINCIȚIAL (VRS)

VRS este un patogen respirator important în pediatrie determinând afecțiuni severe la copilul sub un an: bronșiolită (80%), laringotraheită obstructivă sau crup (40%), pneumonii (40%) (fig. 19.3). Paradoxal, severitatea acestor afecțiuni este mai pronunțată la copiii cu anticorpi materni sau la copiii care au primit vaccin inactivat. Acest lucru se explică prin formarea unor complexe citofile virus - anticorp, care sunt toxice pentru mastocitele din submucoasa arborelui respirator. Distrugerea mastocitelor eliberează factori solubili bronhoconstrictori, care amplifică insuficiența ventilatorie.

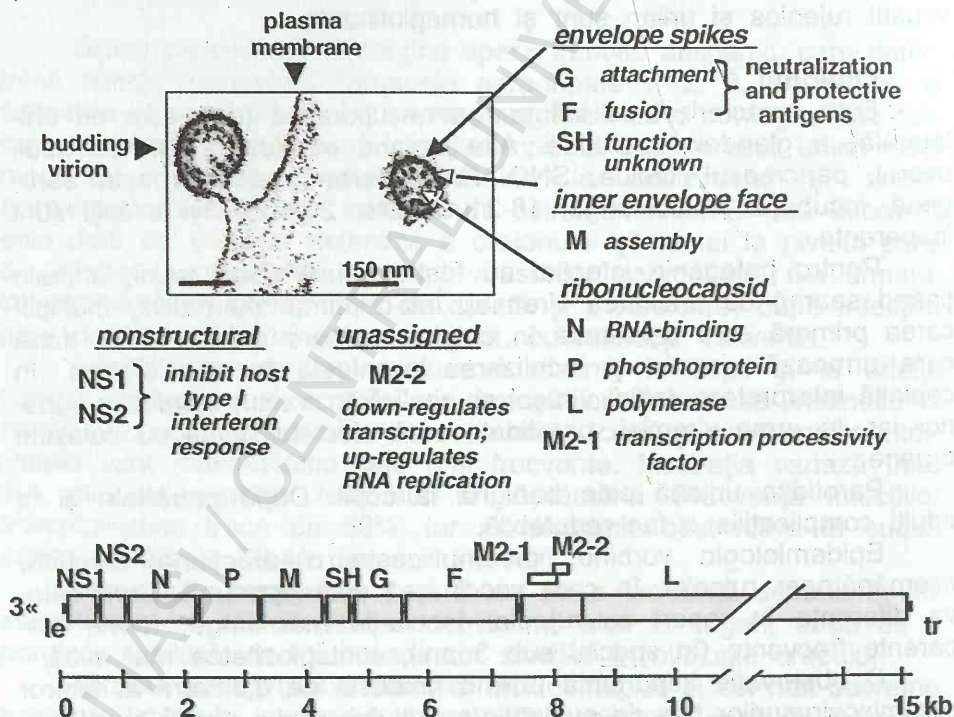


Fig. 19.3. Structura genomului la VRS; în insert imagine electronoptică a virusului în cursul înmuguririi la nivelul membranei celulei infectate. Cadrele de citire ale genomului sunt: NS1, NS2 - pentru proteine nonstructurale care inhibă interferonul; N - nucleocapsidă, P - fosfoproteină, M - proteină matrix cu rol în asamblare, SH - rol incert, G - glicoproteină superficială, F - factor de fuziune, L (large) - polimerază, M2 - proteine reglatorii.

VRS este unul din cele mai fragile virusuri, fiind greu de izolat din probe stocate. Izolarea se face pe culturi de celule inoculate chiar la patul bolnavului. Efectul citopatic este sincițial, virusul nu este hemaglutinant. Alte metode de diagnostic sunt imunofluorescența și tehnicile imunoenzimatică, care pot diferenția două serotipuri A și B.

VRS a fost inițial izolat de la un animal de experiență, fiind etichetat ca virus al corizei la cimpanzeu. Mai târziu, s-a înțeles că cimpanzeul se infectase de la om, fiind vorba despre un patogen specific omului, un virus foarte labil, dar și foarte contagios. Un singur ciclu de îngheț-dezgheț anulează 90% din infectivitate, iar izolările au șanse reale numai dacă produsul patologic este inoculat chiar la patul bolnavului.

Absența hemaglutininei și neuraminidazei au determinat clasificarea VRS într-un gen aparte - pneumovirus (Pn). Virionii sunt excesiv de pleomorfi, anvelopa are franjuri (proiecții lungi și spațiate), nucleocapsida foarte lungă și fragilă.

VRS este un important agent etiologic al infecțiilor respiratorii acute; cel mai de temut pentru sugarul până la 6 luni. Clinica variază cu vârsta infecției; incubatia este de 4-5 zile iar excreția de virus prelungită.

La sugari (1-12 luni) VRS determină pneumonii și bronșiolite, uneori cu evoluție letală subită chiar în prima lună de viață. Sugarii prematuri îngrijiți în saloane de puericultură pot fi infectați nosocomial.

În al doilea an de viață, pneumonia este mai frecventă. De asemenea, VRS a fost implicat în laringotraheite obstructive (crup) și otite medii.

După doi ani, majoritatea copiilor au făcut infecția primară, iar simptomatologia respiratorie (coriza, faringita etc.) rezultă din reinfecții. Astfel de reinfecții sunt probate și la adulți, la personalul sanitar din clinicile de pediatrie care constituie sursa de infecție pentru copii.

Există multe ipoteze pentru explicarea protecției inefficiente prin anticorpi împotriva reinfecțiilor cu VRS. De asemenea, s-a observat un fenomen paradoxal, în sensul agravării simptomatologiei în cazul unor titruri ridicate de anticorpi materni. Rolul toxic al complexelor imune, fenomenele de tip alergic sau reacțiile rezultate din imunitatea mediată celular sunt explicațiile date imunopatologiei VRS induse.

Epidemiologia infecțiilor VRS în zonele temperate este marcată de izbucniri epidemice în sezonul rece. Durata acestor episoade este prelungită datorită reinfecțiilor obișnuite la toate vârstele și excreției de virus care continuă peste 7 zile. Singurul mijloc eficient de profilaxie este reprezentat de alimentația naturală a sugarului. Laptele matern nu acționează atât prin conținutul în anticorpi, cât printr-un inhibitor nespecific, nonimunoglobulinic. Profilaxia infecțiilor VRS în clinicile de pediatrie reprezintă o problemă importantă, pentru soluționarea căreia nu dispunem decât de vechile și bunele măsuri.

de precauție care constau în izolarea bolnavilor și păstrarea regulilor de igienă. Între criteriile de acceptabilitate pentru un prezumtiv vaccin anti-VRS trebuie considerate:

- eficiența în administrarea la copii în primele trei luni;
- lipsa modificării reactivității copiilor la contactul ulterior cu virusul circulant;
- imunizarea eficientă a porții de intrare pentru diminuarea transmiterii naturale a infecției.

Tehnicile imunoenzimatice pot diferenția două serotipuri VRS (A și B), ceea ce complică și mai mult obținerea vaccinului.

Pentru tratamentul infecțiilor respiratorii grave cu VRS se administrează **ribavirină**, un medicament cu spectru antiviral larg, mai ales pe virusurile cu genom ARN. Un medicament nou - **Palivizumab** - a fost introdus recent pentru profilaxia pneumoniei cu virus respirator sincițial (VRS). Palivizumab este un anticorp monoclonal cu specificitate înaltă, folosit pentru a îmbunătăți imunitatea pasivă în infecțiile cu VRS. Palivizumab previne complicațiile grave la copiii sub 24 de luni cu afecțiuni respiratorii cronice și la prematuri, dar nu este indicat în tratamentul infecțiilor VRS deja instalate.

METAPNEUMOVIRUSUL UMAN (Hu-MPV)

În iunie 2001 a fost descris un nou virus respirator uman important în pediatrie: metapneumovirus. Virusul este înrudit cu metapneumovirusurile aviare, dar nu infectează decât omul și nu are origine zoonotică (de la animale). Hu-MPV a fost izolat de la copiii sub 2 ani, prezentând forme severe de bronșiolită. Frecvent, la acești pacienți se evidențiază coinfecții RSV și Hu-MPV, ceea ce contribuie la gravitatea simptomatologiei, ventilația artificială putând fi necesară.

Organizarea genomului ARNss(-) este asemănătoare la RSV și Hu-MPV, expunând următoarea succesiune de gene: 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5' unde N = nucleoproteină, M = proteină matrix, F = proteină de fuziune etc. Aceste gene sunt utilizate și pentru diagnosticul infecției cu hu-MPV prin amplificare genică (RT-PCR).

VIRUSUL RUJEOLOS

Rujeola

Este o infecție sistemică determinată de virusul rujeolos, un agent cu contagiozitate înaltă și care determină rareori infecții subclinice (10-15%).

Modelul structural al virusului rujeolos este identic cu al celorlalte paramixovirusuri, însă absența neuraminidazei și unele particu-

larități ale NC au determinat gruparea într-un gen aparte - morbillivirus - care mai conține patogeni importanți pentru câine (virusul jgodioid), pentru bovine (virusul pestei bovine) și pentru alte rumegătoare mici.

În cazurile tipice de rujeolă, simptomele prodromale (febră, tuse, conjunctivită, rinoree) apar după o incubatie de 10-11 zile. După 4-5 zile de agravare a acestor simptome apar semnul Koplik (punct eritematos pe mucoasa jugală), enanțemul și exanțemul catifelat caracteristic. Rashul rujeolos este maculopapular și durează 8-10 zile. Durata evoluției este adesea prelungită de complicații determinate de virusul însuși (pneumonii, diaree, otite medii, encefalite) sau de suprainfecții bacteriene favorizate de efectul imunosupresor binecunoscut al rujeolei.

Evoluția rujeolei este influențată de statusul nutritiv al copilului și, reciproc, rujeola afectează greutatea copilului datorită inapetenței, febrei, diareei. Deficitul de vitamină A poate precipita complicații corneene, urmate uneori de orbire. De altfel, poarta de intrare a virusului rujeolos este tractul respirator, dar și conjunctiva. După replicarea la nivelul porții de intrare viremia este regulă, virusul parazitând limfocitele. Diseminarea viremică este urmată de replicare în organe: piele, mucoase, plămân, ureche medie etc. Aspectele histologice caracteristice efectului citopatic al virusului rujeolos pot fi sesizate în aceste organe: celule multinucleate cu incluzii (intranucleare și intracitoplasmice) în epiderm, celulele Hecht în plămân etc. În plus, virusul rujeolos produce atât in vivo (în limfocite), cât și in vitro aberații și pulverizații cromozomiale. Rashul și enanțemul sunt rezultatul unei reacții de hipersensibilitate întârziată mediată de reacția limfocitelor T sensibilizate la antigenele virusului. Debutul rashului coincide cu apariția anticorpilor în sânge. Replicarea virală în țesutul limfatic explică anergia consecutivă rujeolei sesizată încă în urmă cu două secole de von Pirquet. Acest autor a descris estomparea reacției la tuberculină în cursul convalescenței după rujeolă.

Deși anticorpii permit evaluarea imunității specifice antirujeoloase, efectorii imunității celulare sunt determinanți în vindecare. Rujeola se vindecă la agammaglobulinemici, însă evoluează fatal în deficiențe congenitale ale imunității celulare (aplazia timică Di George, de exemplu).

Panencefalita sclerozantă subacută (PESS)

Este o infecție lent progresivă a SNC datorată persistenței virusului rujeolos. Frecvența acestei complicații este sub 1 caz la un milion și a scăzut și mai mult după introducerea imunizării antirujeolice. Mai ales băieții de vârstă școlară care au în antecedente rujeola cu debut timpuriu (sub 1 an) fac tardiv această afecțiune nevindecabilă, caracterizată de mioclonii, deteriorare intelectuală progresivă

și moarte. Virusul rujeolos (întrucâtva diferit de tulpinile obișnuite) a fost izolat din biopsiile cerebrale de la bolnavi iar argumente de ordin electronoptic și serologic susțin, de asemenea, etiologia rujeoloasă a panencefalitei. În patogenia PESS intervin atât particularități ale virusului, cât și defecte ale imunității pacientului. Între ipotezele patogenice avansate, credit tot mai mare capătă producția continuă intratecală de variante antigenice minore, care nu pot fi neutralizate de răspunsul imun al gazdei.

Profilaxia rujeolei

Aparent benignă pentru individ, rujeola constituie o boală transmisibilă majoră pentru sănătatea publică prin frecvența complicațiilor, severitatea lor, prin numărul sechelelor handicapante și chiar al deceselor, asociate mai ales encefalitei postrujeolice. Această boală poate și trebuie să fie eradicată prin vaccinare. Vaccinurile vii hiperatenuate existente în prezent asigură o imunitate de durată care, în unele țări, a dus la dispariția cazurilor. Impactul epidemiologic al vaccinării nu este major decât în condițiile unei acoperiri vaccinale de peste 95% din populația susceptibilă. Aceasta poate fi realizată prin vaccinarea an de an a noilor generații de copii susceptibili. Orice relaxare în aplicarea programelor de vaccinare poate readuce rujeola în actualitate. Practica țării noastre a relevat următoarele aspecte:

- vaccinarea timpurie (optim după 9 luni) previne formele grave, inclusiv decese;
 - vaccinarea prea timpurie (între 6-9 luni) determină o proporție semnificativă de lipsă de răspuns (datorită anticorpilor materni), lăsând neprotejați mulți vaccinați;
 - vaccinarea extratimpurie cu vaccin hiperdozat pare a fi o măsură riscantă însoțită de complicații letale;
 - vaccinarea în campanii anuale sau bianuale implică o proporție mare de nevaccinați datorită contraindicațiilor temporare sau sustragerilor de la vaccinare;
 - aglomerarea subiecților nevaccinați sau cu lipsă de răspuns la vaccinare determină periodic ani epidemici cu un număr semnificativ de îmbolnăviri. Un prim efect epidemiologic al vaccinării este răirirea anilor epidemici (care survin o dată la 3-4 ani, în loc de fiecare al doilea an) și creșterea mediei de vârstă a copiilor bolnavi;
 - revaccinarea este o măsură utilă care grăbește întreruperea transmiterii naturale a rujeolei, dar este grevată de un cost ridicat.
- Rujeola va fi eradicată într-un viitor previzibil, urmând probabil poliomielitei. Asocierea vaccinului rujeolos cu alte vaccinuri vii atenuate (rubeolos, urlian) sau inactivate (DTP) este o practică sigură și economică.

În România, vaccinarea sistematică cu 2 doze de vaccin rujeolos a fost integrată în practica antiepidemică în noiembrie 1994 și

constă în administrarea unei prime doze la vârsta de 9-12 luni și a unui rapel la elevii din clasa I primară. Întrucât în multe școli nu există condiții de refrigerare a vaccinului, campania de vaccinare cu doza a II-a de vaccin rujeolos este organizată în decembrie (înainte de vacanța școlară).

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE PARAMIXOVIRALE

Pentru infecțiile paramixovirale sistemice (rujeolă, oreion) diagnosticul este rareori necesar, pentru că aspectele clinice sunt revelatorii. Diagnosticul rapid se impune în virozele cu manifestări respiratorii și el se face prin imunofluorescență pe specimene de spălături nazofaringiene (SNF). Serologia și izolarea virusurilor sunt metode utile mai ales în studiile populaționale. Tehnicile serologice imunoenzimatică relevă frecvența îmbolnăvirilor la diferite grupe de vârstă, stabilind oportunitatea unor intervenții profilactice (revaccinări).

O interesantă problemă de diagnostic este legată de frecvența unor titruri înalte de anticorpi antirujeoși într-o serie de maladii cronice, ca scleroza în plăci, lupusul eritematos, boala Chron ș.a.). Două explicații au fost propuse:

- răspunsul imun heterolog la morbillivirusuri de la animale (exemplu, la jigodie);
- fenomenul de simulare antigenică (*antigenic mimicry*), virusul rujeolos mimând antigene ale selfului semnificative în patogenia autoimună a bolilor citate.

Concluzii

Paramixovirusurile determină afecțiuni sistemice sau respiratorii, mai frecvente și mai grave la copii. Aplicarea vaccinurilor vii atenuate în rujeolă și oreion va scădea incidența bolilor și a complicațiilor lor. VRS și parainfluenza 3 continuă să reprezinte probleme pentru pediatri, fiind cunoscută gravitatea infecțiilor, mai ales în primele 3 luni de viață. Eventualitatea utilizării unor vaccinuri în aceste infecții trebuie amânată până la descifrarea mecanismelor imunopatogenice, care determină uneori simptome grave, în ciuda prezenței anticorpiilor specifici.

Sinteză

Paramixoviridae: genurile morbillivirus și morbillivirus like

Morfologia virionului și genomul viral: virion sferic, pleomorf anvelopat, cu proiecții hemaglutinină. Diametrul: 150-200 nm. În interiorul virionului NC (nucleocapsida are aspect de coloană vertebrală de pește).

Genomul ARNss linear, polaritate negativă, un singur segment, 8 cadre de citire separate de o lungă secvență. Proteinele virale: 5'leader (inițiere) - N (nucleocapsidă) - P (fosfoproteină) - M (matrix) - F (proteină de fuziune) - H (hemaglutinină) - L (proteină largă - transcriptaza) - C (capsidă) - SH (proteina Zn finger asistă transcrierea).

Boli asociate: rujeola, PESS (panencefalită sclerozantă subacută).

Tulpini vaccinante: Moraten, Shwarz, Zagreb, Leningrad 16 etc.

Genul *respirovirus*: virusurile parainfluenza umane 1-4.

Virion sferic, pleomorf anvelopat, diametru >350 nm, nucleocapsida încolăcită în spirală.

Genomul ARNss linear, polaritate negativă, un singur segment, 6 cadre de citire, la capătul 3' o regiune terminală complementară de 17 nucleotide.

Boli asociate: rinite, bronșite, traheite, crupul sau larnigotraheita obstructivă (para 2) la sugari.

Genul *rubulavirus*: virusul oreionului sau parotiditei epidemice.

Virion sferic, pleomorf anvelopat, diametru >250 nm, nucleocapsida încolăcită în spirală.

Genomul ARNss linear, polaritate negativă, un singur segment.

Boli asociate: parotidita epidemică.

Genul *metapneumovirus*

Morfologia virionului și genomul viral: virion sferic, pleomorf anvelopat, diametru: 200-400 nm.

Genomul ARNss linear, polaritate negativă, un singur segment.

Boli asociate: rinite, bronșiolite severe la sugari, pneumonii.

***Pneumovirus*:** virusul respirator sincițial (VSR).

Virion sferic sau filamentos, anvelopat, diametru: 200-350 nm.

Genomul ARNss linear, polaritate negativă, un singur segment, 10 unități de transcriere. Genomul și antigenomul (niciodată libere) se află în NC, rezistente la RN-ază. Tropism pentru epiteliul respirator, virusul rămâne asociat membranei celulare.

Boli asociate: rinite, bronșiolite severe la sugari, pneumonii. Reinfectia comună, uneori gravă. Mortalitate la cazurile spitalizate <2%.

BIBLIOGRAFIE

Habel K. Izolarea virusului oreionului (urlian) în ou embrionat. Publ. Health Rep. 1945;60:201-212.

Enders J, Peebles TC. Propagarea virusului rujeolei în culturi de celule. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954;86:277-286.

Enders J, Peebles TC. Primul vaccin viu atenuat prin adaptare la celule de embrion de găină la 32°C.

- Chanock RM, Finberg. Izolarea RSV uman. Am. J. Hyg. 1957;66:291.
- Kapikian AZ. Vaccinul inactivat anti VRS agravează severitatea infecției. Am. J. Epid. 1966;89:405.
- Osterhaus AD. Descrierea peștei focilor determinată de un virus apropiat rujeolei și jigodiei. Nature 1988;335:5.
- Kawano M et al. Secvența completă a genomului urlian. Nucleic Ac. Res. 1991;19:2739.
- Collins PL et al. Reconstrucția RSV din ADN sintetic clonat. PNAS 1995;92:11563.
- Wright PF et al. Evaluarea unui vaccin atenuat anti VRS. J. Infect. Dis. 2000;182:1331.

ARBOVIRIDAE

De reținut:

Arbovirusurile sunt caracterizate de un ciclu biologic care implică replicarea alternativă la gazde vertebrate și artropode. Acest grup ecobiologic înglobează agenți aparținând toga-, flavi-, bunya-, orbi- și rhabdovirusurilor. Catalogul Internațional al arbovirusurilor înregistrează peste 400 de agenți, dar numai 15-20% dintre ei au fost izolați de la om, unii având semnificație pentru sănătatea publică. În România și în țările limitrofe arbovirusurile cu importanță medicală aparțin familiilor: flavivirusuri (grupul encefalitei ruse de primăvară - vară, ocazional, febra Denga, meningoencefalita West Nile), bunyavirusuri (grupurile bunyamwera, Tahyna-Lumbo, agenții febrei hemoragice de Crimeea) și orbivirusuri (complexul Kemerovo, transmis de căpușe).

Deși clasificarea actuală nu menționează arbovirusurile ca grup taxonomic, superfamilia arbovirusuri și-a păstrat și în prezent semnificația ecobiologică. Arbovirusurile sunt virusuri cu genom ARNss, anvelopate, transmise, în primul rând, dar nu exclusiv, prin mușcătură insectelor hematofage (vectori). Există peste 400 de specii, din care numai o parte sunt clasificate în patru familii distincte: toga-, flavi-, bunya- și arenaviridae.

Toate arbovirusurile sunt fragile și depind de gazda vector (țânțari, căpușe, purici) care funcționează adesea ca amplificator al concentrației virale. Arealul lor de răspândire este condiționat de nișa ecologică a vectorului.

Ciclul de viață al arbovirusurilor trebuie urmărit în trei tipuri de gazde:

- **rezervorul de virus** (păsări și mamifere, sălbatice sau domestice);
- **insecte vectoare** sau, pentru altele, **rozătoare vector** (arbovirusuri);
- **gazda terminală (dead-end)** - omul - la care viremia este insuficientă pentru a favoriza transmitia.

Studiile de seroprevalență indică răspândirea arbovirusurilor cu preponderență în zonele tropicale și subtropicale. Arbovirusurile pot

provoca însă focare epidemice și în alte areale. Transportul virusurilor și al vectorilor de către păsările migratoare explică incidența mai mare a arbovirozelor în Delta Dunării și în regiunile limitrofe. Infecțiile arbovirale sunt zoonoze și prevenirea lor este legată de controlul vectorilor. Distribuția geografică și sezonieră a arbovirozelor este dependentă de comportamentul vectorilor (vezi dicționarul de arbovirologie la sfârșitul capitolului). Păsările migratoare pot dispersa arbovirusurile pe areale largi.

Omul este gazdă incidentală, la care se realizează un ciclu terminal fără transmitere ulterioară a virusului. Singurele excepții notabile de la această regulă sunt ciclurile biologice ale arbovirusurilor responsabile de producerea febrei Denga și a febrei galbene. În general, arbovirusurile determină infecții asimptomatice, boala producându-se numai la gazdele incidentale (om sau cal), de la care transmiterea virală nu mai este posibilă (fig. 20.1).

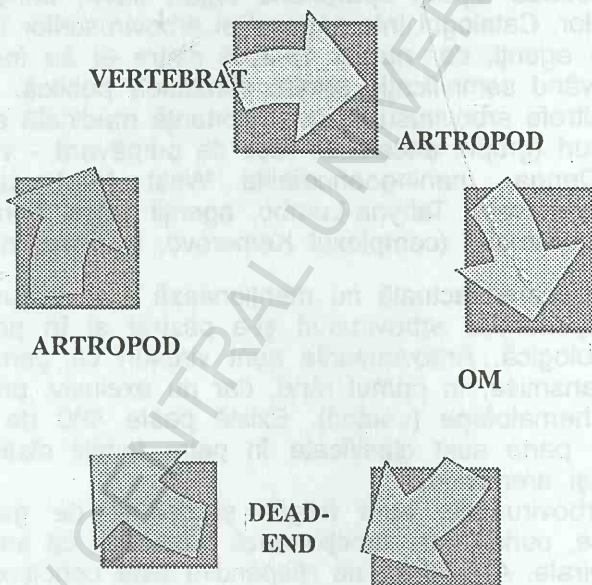


Fig. 20.1. Ciclul de viață al arbovirusurilor. Vectorul artropod (țânțari, căpușe etc.) funcționează adesea ca gazdă amplificatoare a concentrației virale.

REPLICAREA ARBOVIRUSURILOR

Replicarea arbovirusurilor diferă la cele cu genom ARN cu polaritate pozitivă (toga și flavi) de cele cu genom ARN, segmentat, cu polaritate negativă (bunya și arena).

La primele, genomul funcționează ca ARNm, care este tradus în proteine structurale și nestru structurale. Asamblarea virionilor maturi se

face prin înmugurire la nivelul membranei celulare. Replicarea bunyavirusurilor este asemănătoare cu a virusurilor gripale. Polimeraza virală asigură sinteza spirei complementare (ARN +) care formează un intermediar dublu spiralat pe care se sintetizează genomurile progene. Virionii maturi se eliberează la nivelul aparatului Golgi în vacuole intracitoplasmice nediferențiate.

TABELUL 20.I

FAMILIILE INCLUSE ÎN GRUPUL TAXONOMIC TRADIȚIONAL AL ARBOVIRUSURILOR

<i>Familia</i>	<i>Genul</i>	<i>Specia prototip pentru om</i>	<i>Genomul</i>
Togaviridae	Alphavirus Rubivirus	V. rubeolos	ARNss(+) ~11,7 kb
Flaviviridae	Flavivirus Hepacivirus	V. febrei galbene V. hepatitei C (VHC)	ARNss(+) ~10,5 kb
Bunyaviridae	Hantavirus Nairovirus	V. Hantaan V. encefalitei Crimeea	ARNss(-) 3 segmente
Arenaviridae	Arenavirus	V. choriomeningitei limfocitare	ARNss ambisens 2 segmente

CLASIFICARE

Din tabelul 20.I rezultă varietatea arbovirusurilor și a simptomatologiei determinate de acești agenți. Reținem frecvența infecțiilor asimptomatice, precum și a ignorării acestei alternative diagnostice în lipsa posibilităților de investigare specifice laboratorului de virusologie.

Catalogul Internațional al arbovirusurilor cuprinde peste 400 de specii răspândite pe toate continentele. În acest capitol discuția va fi restrânsă la speciile virale relevante pentru Europa Centrală și de Est cu potențial epidemiologic și în România (tabelul 20.II).

TABELUL 20.II.

ARBOVIRUSURI IMPORTANTE PENTRU PATOLOGIA UMANĂ ÎN EUROPA CENTRALĂ ȘI DE EST

<i>Specia</i>	<i>Familia</i>	<i>Vector</i>
V. encefalitei de căpușe	Flaviviridae	Căpușe
V. West Nile	Flaviviridae	Țânțari
V. febrei hemoragice Crimeea	Bunyaviridae	Țânțari
V. Tahyna-Lumbo	Bunyaviridae	Țânțari
Grup Kemerovo	Orbivirusuri	Căpușe

TOGAVIRIDAE

Togavirusurile au virioni cu simetrie icosaedrică (50-70 nm), înveliți într-o anvelopă pe care se află proiecții glicoproteice, cu proprietăți hemaglutinante. Genomul este ARNss cu polaritate pozitivă și infecțios.

Hemaglutinarea cu arbovirusuri are câteva particularități: antigenul trebuie concentrat (prin extracție cu acetonă); hematiile sensibile provin de la specii de păsări mai puțin obișnuite în laborator (papagal, gâscă, pui de găină de 24 de ore), iar pH-ul și temperatura reacției sunt critice. În studiile serologice prin hemaglutinoinhibare rezultatele sunt mai puțin specifice decât rezultatele în reacția imunoenzimatică (ELISA)

Spectrul de gazdă: păsări, mamifere, om; vectori: tânțari. Infecțiile sunt asimptomatice la insecte, la păsări și în proporție de peste 90% la celelalte gazde.

Patogenia bolii la om: după mușcătura insectelor vectoare (numai femelele sunt hematofage), virusul se replică în endoteliul capilar și diseminează sistemic. Simptomatologia este fie neurologică (meningoencefalite), fie numai cutanată (febre hemoragice) sau vizând alte organe (ficat). Există vaccinuri aplicate în arealele endemice (ex. pentru encefalita japoneză).

Sinteză

Familia *togaviridae* cuprinde două genuri foarte diferite: alphavirus și rubivirus.

Alphavirus: exemplu, virusul encefalitei ecvine de Est.

Morfologia virionului: virion icosaedric, cu capsidă și anvelopă cu proiecții glicoproteice, 8 nm lungime. Diametrul: 60-70 nm.

Genom ARNss linear, sens pozitiv, cu dimensiunea de 12 kb, cu un singur segment cu 2 gene.

Boli asociate: encefalite umane, mai multe vaccinuri inactivate testate.

Rubivirus - cu o singură specie - virusul rubeolei.

Morfologia virionului: virion icosaedric, cu capsidă și anvelopă cu proiecții glicoproteice 8 nm lungime. Diametrul 60 nm.

Genom ARNss linear, sens pozitiv, cu 10 kb, cu un singur segment cu 2 gene.

Boli asociate: rubeola - boală eruptivă a adolescentului, cu febră moderată și adenopatie (retroauriculară, mai frecvent). Sindromul rubeolos congenital: glaucom, surditate, malformații cord și vase mari, retardare mentală.

Vaccin rubeolos viu atenuat recomandat fetelor după 12 ani pentru prevenirea sindromului rubeolos congenital.

FLAVIVIRIDAE

La fel ca și togaviridele, flavivirusurile se replică în insecte vectoare (țânțari) sau la păsări, care rămân asimptomatice. Spectrul bolilor produse la mamifere și om este variat: meningoencefalite, febre hemoragice, hepatite, afecțiuni articulare cu rash etc. Nu sunt rare nici infecțiile asimptomatice. Formele neurologice sunt mai frecvente la bătrâni, unde letalitatea poate ajunge la 10% (8%, în România în epidemia de meningoencefalite West Nile din vara 1996). Alte flavivirusuri importante sunt febra galbenă și febra Denga.

Virusul hepatitei C este genomic înrudit cu flavivirusurile și clasificat într-un gen aparte - *hepacivirus* (vezi capitolul Hepatite virale). Transmiterea sa este parenterală, mai ales prin transfuzii de sânge, și nu mediată de vectori.

Sinteză

Flaviviridae: virusurile febrei galbene, febrei Denga, virusurile encefalitelor japoneză, West Nile, St. Louis etc.

Morfologia virionului și genomul viral: virion sferic sau icosaedric, diametrul 45-50 nm, anvelopă cu mici proiecții.

Genomul ARNss, linear, cu polaritate pozitivă. Pe matrița genomului viral se sintetizează un precursor procesat în continuare pentru a sintetiza următoarele proteine: 5'-C(capsida)-prM-E(anvelopa)-NS1-NS2A-NS2B-NS3(helicaza)-NS4A-NS4B-NS5-3' (fără coadă poli A).

Boli asociate: febra galbenă, febra Denga, encefalita japoneză, encefalita de căpușă, meningoencefalita West Nile, febra hemoragică Omsk etc.

Virusurile au un ciclu natural cu gazde care fac infecții asimptomatice (păsări, rozătoare) și insecte vectoare (țânțari Culex, Anopheles etc.). Omul este gazdă terminală.

Vaccinare: cu virus viu atenuat tulpina Asibi în febra galbenă (Theiler); cu virus viu sau vaccin inactivat în encefalita japoneză și encefalita de căpușă.

BUNYAVIRIDAE

Bunyavirusurile sunt patogeni importanți pentru animalele domestice din zonele subtropicale: epizootii cu milioane de cazuri au fost semnalate în Etiopia, Somalia, Kenya. Insectele pot transmite boala și la om. Un gen aparte - hantavirus - are rezervorul natural murin (șoareci sălbatici). Hantavirusurile nu se transmit prin insecte vectoare, ci sunt excretate în dejectele animalelor infectate, care pot fi viruli-

fer. Boli umane semnificative determinate de hantavirusuri sunt nefropatia endemică balcanică și sindromul pulmonar cu hantavirusuri (cu mortalitate mare).

Sinteză

Bunyaviridae. Gen bunyavirus. Specii: virusul encefalitei de California, virusul La Crosse.

Morfologia virionului și genomul viral: virusurile bunyamwera umane au structură sferică sau pleomorfă. Virionul este anvelopat, cu diametrul de 80-120 nm, la suprafața anvelopei se află proiecții glicoproteice de 8-10 nm.

Genomul ARNss linear, sens negativ, alcătuit din trei segmente și 4-6 cadre de citire. Dimensiune: 12,5 kb.

Boli asociate: multiple forme de encefalite severe la om: encefalita de California, boala Tachyna (în Cehia și alte țări est-europene). Encefalitele Akabane, Oropouche (în Africa) etc.

Genul hantavirus

Morfologia virionului și genomul viral: hantavirusurile umane au structură sferică. Virionul este anvelopat, cu diametrul de 80-120 nm, la suprafața anvelopei se află proiecții glicoproteice care alcătuiesc o rețea. Infectează persistent linii celulare fără a da ECP.

Boli asociate: infecție hantavirală cu sindrom pulmonar sever - HFRS - (pneumonie interstițială, edem pulmonar, șoc; letalitate >50%) sau mediu (letalitate <0,3%). Virusul se transmite prin aerosoli, iar rezervorul este reprezentat de rozătoare care-l excretă.

ARENAVIRIDAE

Arenavirusurile au ca și hantavirusurile potențial letal deosebit (nu pot fi manipulate decât de laboratoare care au facilități de biosecuritate de nivel 3 sau 4: de maximă restricție). Bioterrorismul este o etichetă ce desemnează pericolul folosirii criminale a unor agenți infecțioși (între care hanta- sau arenavirusurile) ca arme bacteriologice. Un astfel de virus este agentul febrei Lassa (Nigeria), care dă o mortalitate de peste 80% și care are un potențial mare de diseminare. În afară de lassavirus, un alt arenavirus este virusul choriomeningitei limfocitare, care dă infecții cronice la șoareci și, uneori, meningite la om. Toate arbovirozele au potențial de diseminare dincolo de limitele nișei ecologice naturale, fiind recunoscute ca viroze potențial emergente.

Sinteză

Arenavirus: virusul choriomeningitei limfocitare (LCMV), virusul febrei Lassa.

Morfologia virionului și genomul viral: arenavirusurile umane au structură sferică sau pleomorfă. Virionul este anvelopat, cu diametrul de 90-130 nm, la suprafața anvelopei se află proiecții de 8-10 nm. Ribozomii celulari se regăsesc în centrul virionului ca niște grăunțe de nisip.

Genomul ARNss linear, ambisens, alcătuit din două segmente și 4 cadre de citire. În interiorul genomului secvențe intergenice formează structuri complementare (în ac de păr). Totdeauna în ARN viral extras se regăsesc contaminanți de ARN ribozomal al celulei gazdă.

Boli asociate: choriomeningita limfocitară, febra Lassa, febra hemoragică argentiniană, boliviană, venezueleană. Toate afecțiunile de mai sus sunt zoonoze, rezervorul de virus fiind rozătoarele (șoarecii perdomestici sau sălbatici). Febra Sabia apare numai la om, rezervor neprecizat. Caracteristicile bolilor umane: febră, mialgie, astenie, dureri de cap, implicarea SNC, hemoragii subcutanate sau submucoase (cu artralгии, abdomen acut etc.).

CLINICA INFECȚIILOR ARBOVIRALE LA OM

Marea diversitate de specii arbovirale determină o varietate de sindroame grupate în patru categorii:

1. febră, artralгии cu sau fără exantem (exemplu: boala Denga);
2. febrele hemoragice (Omsk, Crimeea etc.);
3. febre hemoragice cu hepatită și nefrită (febra galbenă);
4. encefalite (denumite după areal: japoneză, de California, australiană etc.). Evoluția este gravă, cu letalitate semnificativă sau cu leziuni sechelare importante. Din fericire, numărul formelor clinice manifeste este de una la câteva sute de infecții inaparente.

Febra Denga

Este determinată de 4 tipuri antigenic diferite de flavivirusuri. Vectorul este o specie de țânțari diferită după arealul geografic considerat: zona Caraibelor, Asia sau insulele din Pacific. Gazdele mamifere sunt omul și maimuțele.

Denga este o boală acută febrilă cu debut abrupt și evoluție severă în 2-3 zile, cu hemoragii subcutane (purpură) sau gastrointestinale și șoc hemoragic. Determinismul șocului hemoragic în Denga a fost relativ recent explicat. Mecanismul este imun, și anume exagărarea simptomatologiei - în mod paradoxal - de formarea complexelor antigen - anticorp.

Febra galbenă

A fost considerată inițial ca o problemă limitată la transmiterea interumană. În 1900, Walter Reed a demonstrat rolul vector al țânțaru-

lui *Aedes aegypti*, marcând debutul arbovirologiei. Există două forme distincte epidemiologic: febra galbenă urbană și silvatică. În primul caz, insecta vectoare este țânțarul *Aedes*; în al doilea caz, diverse insecte care pot mușca omul pătruns inoportun în junglă. Febra galbenă silvatică implică transmiterea între țânțari și primat nonhominoide, omul fiind gazdă accidentală.

Izbucnirile urbane pot determina sute (chiar și mii) de cazuri și reprezintă o amenințare substanțială la adresa sănătății publice.

Ocazional, febra galbenă este exportată în Europa sau America de Nord (în principal, datorită eșecului vaccinării de a proteja călătorii în zonele endemice). OMS estimează că în fiecare an survin 200 000 de îmbolnăviri, din care 30 000 sunt letale.

Rata fatalității este de 5-7% în majoritatea cazurilor și aproximativ 20% în unele epidemii la pacienții spitalizați, în timp ce la pacienții cu sindrom sever atinge 50%.

Boala debutează acut cu migrenă, mialgie, fotofobie și apoi afectare hepatorenală. Histopatologic este caracteristică necroza în zona mediană a lobulului hepatic. Virusul febrei galbene sau virusul amaril se izolează din sânge sau ficat (post-mortem). Din 1930 sunt disponibile vaccinuri vii atenuate care se administrează obligatoriu pentru cei ce se deplasează în zonele endemice.

PROBLEME ECOLOGICE

Arbovirusurile sunt răspândite în întreaga lume atât în zonele subtropicale și tropicale, cât și la latitudini mai reci. Ciclul lor natural este facilitat de transmiterea și replicarea la insecte și vertebrate.

Multe variabile influențează probabilitatea infecției omului:

- biologia insectei vectoare;
- factori climaterici care afectează longevitatea vectorului, disponibilitățile de hrană ale acestuia, frecvența reproducerii etc.;
- apropierea colectivităților umane de zonele silvatiche endemice;
- factori nocivi fizici, chimici, biologici din mediu etc.

Câteva progrese au marcat studiile arbovirusurilor în ultimele decade:

- evidențierea infecțiilor persistente la gazde vertebrate (de exemplu, în condiții de hibernare), care asigură rezervorul de virus capabil să mențină potențialul infectant între sezoanele calde, epidemice;
- evidențierea transmiterii transovariene a virusurilor la artropode, care facilitează și ea cicluri alternative de menținere a virusului în natură;
- apariția de noi virusuri, apariție relevată de episoade epidemice în zone geografice indemne până atunci.

Rolul amplificator al insectelor vectoare a fost bine stabilit. Perioada de timp necesară pentru ca replicarea arbovirusului la insecte să asigure un titru suficient pentru infecția vertebratelor este denumită "incubație extrinsecă". Severitatea infecției umane poate varia de la infecție inaparentă la exitus. În general, omul este o gazdă incidentală și o cale fără ieșire pentru transmiterea virală. Ecologic vorbind, există două alternative care pot culmina în infecția umană:

- omul intră în nișa ecologică a insectei vectoare;
- ciclul natural al transmisiei virale se mută, apropiindu-se spațial de colectivitățile umane.

Studiul arbovirozelor reclamă cooperarea multor specialități: medici, veterinari, zoologi, ecologi etc. Riscul infecției personalului sanitar este notabil. Există raportate câteva sute de cazuri reprezentând infecții profesionale sau de laborator și câteva zeci de decese relatate la medici.

ARBOVIROZE SEMNIFICATIVE PENTRU ROMÂNIA

Encefalita rusă de primăvară - vară. Este determinată de virusul encefalitei de căpușă (*tick borne encephalitis* - TBE). Este o specie reprezentativă pentru complexul flavivirusurilor encefalitogene transmise de căpușe, virusuri răspândite larg în Europa, de la Insulele Britanice la Urali. Rezervorul de virus este constituit de rozătoarele sălbatice, dar și de alte mamifere mai mari. Animalele domestice pot participa la ciclul infecțios. Omul este infectat prin mușcătura capușei sau, foarte rar, prin consum de lapte de la capre infectate. Infecțiile se manifestă prin semne neurologice, având o evoluție severă cu mortalitate ridicată. Diagnosticul clinic frecvent este de meningoencefalită cu pareze, convulsii, letargie și comă.

Un alt membru al aceleiași grup care poate incidental să afecteze și bolnavi din teritoriul țării noastre este **virusul febrei hemoragice Omsk** (endemic în Siberia).

Febra hemoragică de Crimeea. Este determinată de bunya-virusuri izolate de la țânțari. Studii serologice la om și animale au arătat prezența relativ frecventă a anticorpilor împotriva acestor virusuri în zona Deltei Dunării. Păsările sunt vertebratele cel mai frecvent infectate. În Peninsula Crimeea și în alte regiuni din Ucraina se înregistrează uneori sute de îmbolnăviri care se manifestă ca febre hemoragice, cu hepatită, sau ca febre cu dureri musculare sau ale articulațiilor. Formele encefalitice sunt rare. Febra prelungită are o evoluție bifazică: primul vârf în cursul viremiei, al doilea în perioada simptomatologiei viscerale. De notat că nu există tablouri clinice caracte-

ristice și, mai ales, cazurile sporadice se diagnostichează rar sau sunt fals etichetate ca gripă sau malarie.

Meningoencefalitele produse de virusurile din grupul serologic asemănător: St. Louis, West Nile și encefalita japoneză pot determina uneori forme clinice cu rash și hepatite. Formele neurologice sunt mai frecvente la bătrâni, unde letalitatea poate ajunge la 10% (8%, în România în epidemia de meningoencefalită West Nile din vara 1996, cu peste 800 de cazuri).

Un alt grup de bunyavirusuri care circulă în Europa Centrală și de Nord (până în regiunea arctică) este denumit **Tahyna-Lumbo**. Infecțiile sunt în general blânde, uneori cu manifestări de meningite aseptice. Virusurile au fost izolate de la țânțari și iepuri (rezervor al virusului), foarte rar de la om.

Orbivirusurile din grupul Kemerovo determină îmbolnăviri febrile cu simptomatologie neurologică răspândite pe teritoriul european al fostei Uniuni Sovietice. Ele constituie un pericol potențial și pentru România.

Concluzii

Arbovirusurile aparțin mai multor familii de virusuri: flavi-, toga-, bunya- și arenaviridae. Arbovirusurile (arthropod borne) sunt menținute în natură prin transmiterea ciclică între vertebratele susceptibile și artropodele hematofage. Virusul se multiplică în ambele gazde. Transmiterea biologică care depinde de amplificarea viremică la insectă trebuie deosebită de transmiterea mecanică - rezultat al transferului rapid de la o gazdă la alta, în care insectele nu amplifică virusul. În general, infecția insectelor este silențioasă, simptomele severe aparând numai la om, maimuțe, cai.

DICȚIONAR DE ARBOVIRUSOLOGIE

1. **ciclu terminal** = infecție sporadică a unei gazde (vertebrat) incidentale, care are loc într-un habitat nou unde vectorul lipsește (exemplu: febra galbenă silvatică sau de junglă);

2. **ciclu secundar** = infecție sporadică sau epidemică inițiată de la gazde incidentale parazitare de artropode, de obicei diferite de vectorii naturali (exemplu: febra galbenă urbană);

3. **gazda de menținere** = gazde naturale (vertebrate și insecte), care mențin ciclul de transmitere viral;

4. **gazda amplificatoare** = gazda la care replicarea activă a virusului permite atingerea unui titru viral suficient pentru ca artropodele hematofage să devină vectori eficienți;

5. **gazda incidentală** = gazda infectată în urma intrusiei în habitatul unui arbovirus; gazda la care se realizează un ciclu terminal simptomatic sau, mult mai frecvent, asimptomatic (de regulă, omul);

6. **habitat** = ecosistemul în care prevalează un anumit arbovirus și gazdele sale: vertebrate (păsări și mamifere) și insecte;

7. **incubație extrinsecă** = intervalul între momentul infecției artropodului și momentul când insecta devine infectantă în urma multiplicării virusului;

8. **transmisie transovariană** = operantă la arbovirozele transmise de căpușe, mai puțin la cele transmise de țânțari; mai multe generații succesive de insecte pot fi infectate transovarian;

9. **transmisie venerică** = căpușele și țânțarii masculi nu se hrănesc cu sânge, totuși ei transmit arbovirusurile femelelor în cursul copulației;

10. **vector** = gazdă artropod indispensabilă pentru transmiterea arbovirusurilor;

11. **zoonoze** = infecții transmise de la animal la om.

BIBLIOGRAFIE

- Borio L, Inglesby T, Peters CJ et al. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. JAMA 2002;287:2391-405.
- Cernescu C, Ruță S. Progrese în controlul și prevenirea virozelor cu potențial bioterorist. Edit. Universitară "Carol Davila", 2004, p.216, ISBN: 973-7918-94.

RHABDOVIRIDAE

De reținut:

Virioni în formă de glonț, cu nuleocapsidă helicoidală și anvelopă, cu dimensiuni de 175 x 75 nm. Genom ARNss, cu polaritate negativă nesegmentat.

Proprietăți importante: spectru de gazdă foarte larg, virusul rabic poate infecta toate homeotermele; la cele mai multe mamifere infecția este letală. Incubația lungă a bolii face posibilă aplicarea terapeutică a vaccinării (după mușcătura animalului rabid) asociată cu sero- sau imunoglobulinoprofilaxie (Babeș).

Istoric. Oroarea câinelui turbat a înspăimântat omul din cele mai vechi timpuri. Turbarea sau hidrofobia este considerată boala transmisibilă cu cea mai mare letalitate. În 1885, mult timp înaintea recunoașterii etiologiei virale a bolii, Pasteur a aplicat la om primul vaccin creat artificial, în laborator. Ulterior, acest vaccin a fost ameliorat atât ca metodologie de fabricație, cât și ca schemă de imunizare. Introducerea seroprofilaxiei odată cu vaccinarea, ca rezultat al studiilor lui Victor Babeș, constituie una din cele mai cunoscute contribuții românești în virusologie. De altfel, cercetări la fel de semnificative au avut și alți cercetători români (tabelul 21.1).

CLASIFICARE

Familia rhabdoviridae cuprinde peste 80 de virusuri care parazitează gazde foarte diferite: plante, insecte, vertebrate poikiloterme și homeoterme. Două genuri grupează speciile de rhabdovirusuri: lyssavirus (lyssa-turbare) și veziculovirus. Speciile prototip sunt virusul rabic și, respectiv, virusul stomatitei veziculare (VSV).

PROPRIETĂȚI STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE VIRIONULUI

Morfologia particulelor virale este alungită, cu aspect de "glonț" mai mult sau mai puțin trunchiat. Stocurile de virus cu conținut bogat

TABELUL 21.1

PRIORITĂȚI ROMÂNEȘTI ÎN STUDIUL TURBĂRII

Autorul	Conținut	Referința
Babeș Victor	Vaccinarea antirabică	Ann.Inst. Pasteur 1889;7:389
Babeș Victor	Seroterapie	România Medicală, 1994, p.467-469
Levaditi Constantin	Cultivare in vitro	C.R. Soc. Biol. 1913;75:505
Nicolau ȘS, Kopciowska L	Metodă colorare	C.R. Soc. Biol. 1929;101:655
Nicolau ȘS, Kopciowska L	Persistența virusului la animale vaccinate	C.R. Soc. Biol. 1932;110:348
Atanasiu P, Lepine P	Cultivare în celule tumorale	Ann.Inst. Pasteur (Paris) 1959;96:72-78
Atanasiu P et al	Electronmicroscopie	C.R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Serie D 1963;256:3219-3221
Atanasiu P et al	Interferon în profilaxie	Ann. Inst. Pasteur (Paris) 1970;119:767-770
Atanasiu P et al	Tehnica imunoperoxidazei	Ann. Inst. Pasteur (Paris) 1971;121:247-250
Nicolau, Constantinescu NM, Duca M	Rolul somnului în rabie	Bul Stiint Sect Stiint Medicale Acad RPR. 1953;5:229-31
Cajal N, Dănescu G	Imunizare sub cortizon	St. Cerc. Inframicrobiol. 1959;10:447

de particule defectiv interferente (capitolul 6) prezintă proporțional mai mulți virioni trunchiați, neinfecțanți. Nucleocapsida helicoidală și anvelopa sunt asemănătoare morfologic paramixovirusurilor. Ambele au genomul ARNss, nesegmentat, cu polaritate negativă.

Elementul critic în imunitatea antirabică îl constituie determinanții antigenici ai proteinei G care intră în structura anvelopei. Proteina G conține peste 500 de aminoacizi și 12-17 epitopi. Omologia în secvența de aminoacizi a diferitelor tulpini de virus rabic atinge 90%, în timp ce între virusul rabic și VSV omologia este de numai 20%. Totuși, conceptul clasic al unicității antigenice a virusului rabic a fost modificat de studiile cu anticorpi monoclonali, care au evidențiat și tulpini divergente în raport cu arealul geografic și specia gazdă. Virusul rabic izolat de la lilieci este relativ heterogen, fapt ce poate constitui o amenințare pentru inițierea unor enzootii la animale terestre care să nu poată fi controlate cu tulpinile vaccinante actuale.

Virusul rabic (lyssavirus) face parte din familia rhabdoviridae - virusuri ARNss cu polaritate negativă - în formă de glonț (fig. 21.1).

Genomul modular al virusului rabic codifică 5 proteine structurale: N - nucleoproteina, P - proteină fosforilată, M - proteina matrix, G - glicoproteina superficială și L - polimeraza ARN dependentă de ARN. Aproximativ 1 800 de molecule de glicoproteină G se dispun palisat pe suprafața virionului, iar "vârful" expus al fiecărei molecule conține epitopul care determină anticorpilor protectori. Anticorpilor seroneutralizanți sunt induși de moleculele G grupate; moleculele G separate, solubile, nu numai că sunt slab imunogene, dar expun și epitopi care competiționează cu seroneutralizarea.

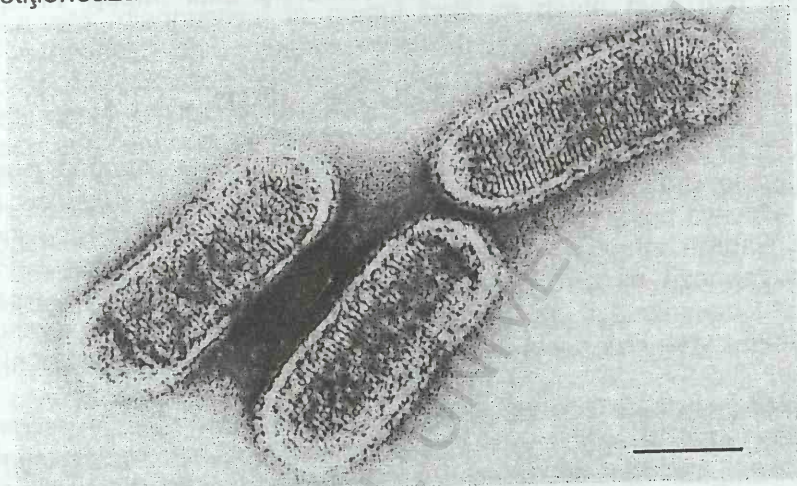


Fig. 21.1. Virioni de rabie la microscopul electronic. Remarcați forma de glonț și proiecțiile anvelopei. Bara = 100 nm.

Virusul rabic sălbatic este numit "de stradă" și are o incubatie variabilă; pasaje intracerebrale repetate la aceeași specie stabilizează și scurtează incubatia, tulpinile fiind etichetate ca "virus rabic fix". Leziunile citopatice sunt exclusiv intracitoplasmice și au aspectul unor incluzii granulare numite corpuri Babeș Negri. Tulpinile de virus fix dau incluzii mici. Corpuri Babeș Negri predomină în neuronii din cornul Ammon din hipocamp și în celulele Purkinje din cerebel. Aceste leziuni corespund situsurilor replicării virale. Interesant, în celulele glandelor salivare virusul se replică și se eliberează prin înmugurire la nivelul membranei celulare, ceea ce reprezintă o adaptare eficientă pentru propagarea infecției la o nouă gazdă. În afara neuronilor și celulelor glandelor salivare, antigenul rabic mai poate fi evidențiat în corne, piele, mucoasa bucală - elemente care au valoare diagnostică.

Patogenia infecției este condiționată de diseminarea septinevritică centripetă a virusului de la nivelul plăcuțelor neuromusculare periferice către SNC. Din SNC virusul se propagă centrifug pe calea filetelor senzitive (septinevrită) și se secretă în salivă.

În patogenia infecției rabice tropismul pentru celula gazdă este determinant. Localizarea specifică a replicării virale în diferite țesuturi și, în acestea, în diferite celule determină clinica infecției. Virusul rabic este neurotrop prin excelență și are o afinitate specială pentru receptorul acetilcolinic din joncțiunea neuromusculară. Alterările morfologice determinate de replicarea virusului rabic interesează atât elementele presinaptice (nervoase), cât și cele postsinaptice (musculare). Infecția rabică are capacitatea de a altera antigenitatea receptorilor acetilcholinici, acesta fiind un mecanism comun și altor infecții virale.

REZERVORUL DE VIRUS

Rabia sau turbarea este o infecție întâlnită la mai multe specii de animale domestice - câine, pisică, bovine - sau sălbatice (lupi, vulpi, lilieci-vampiri) de la care omul se poate contamina ocazional. Odată stabilită infecția în SNC, finalul este totdeauna decesul. Rabia este o zoonoză majoră, determinând anual circa 60 000 de decese; boala nu diseminează de la om la om decât excepțional. Severitatea mușcăturii determină riscul infecției și durata incubației (săptămâni sau luni).

Rezervorul de infecție este în Europa "silvatic" - la animalele sălbatice (vulpi în special). În alte țări, rezervorul este reprezentat de șacali, lupi, raccooni sau lilieci-vampiri. De la aceștia din urmă rabia se poate propaga și prin aerosoli.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Diagnosticul de laborator în rabie este o urgență. El se referă, în primul rând, la diagnosticul bolii la animalul bănuit a fi rabid. Diagnosticul se face prin:

- examinarea creierului pentru incluzii (diagnostic în câteva ore);
- inocularea animalelor de laborator (diagnostic în 4-21 de zile);
- diagnostic rapid prin imunofluorescență pentru identificare.

De regulă, incluziile Babeș Negri trebuie confirmate prin imunofluorescență, inoculări la animale, identificări serologice. Șoarecele sugar este animalul cel mai susceptibil. Deși incubația poate dura până la 3 săptămâni, prezența antigenului rabic în creier poate fi confirmată mai devreme prin imunofluorescență.

Confirmarea serologică a diagnosticului la animal trebuie făcută, pentru că animalele pot muri cu infecții intercurrente sau ca urmare a multiplicării altor virusuri din specimenul de diagnostic. De asemenea, există alte incluzii care pot mima corpii Babeș Negri.

La câine sau pisică se urmărește comportamentul animalului izolat în cușcă - dacă supraviețuiește fără simptome peste 8 zile nu este rabie. Dacă animalul a fost sacrificat se urmăresc leziunile din hipocamp sau se fac reacții de imunofluorescență. Aceste leziuni, localizate într-o regiune a SNC dedicată comportamentului, au justificat afirmația "adaptării cinice" a virusului rabic la gazda parazitată, întrucât, modificând afectul animalului (care devine agresiv), se favorizează transmiterea infecției. La omul mușcat diagnosticul se face pe probe de ser, salivă, LCR prin amplificare genică (RT-PCR).

La om, diagnosticul în cursul bolii se poate face prin identificarea antigenului prin imunofluorescență pe amprente corneene sau pe biopsii din mucoasa bucală sau din piele. Diagnosticul post-mortem vizează, ca și la animal, evidențierea incluziilor Babeș Negri, izolarea la șoarece și examenele de imunofluorescență pe secțiuni din creier. Diagnosticul serologic este util numai în cazul în care nu s-a administrat vaccin (seroneutralizare, inhibiția focarelor de imunofluorescență, imunodifuzia Outcherloney).

Diagnosticul diferențial se face cu encefalite de alte etiologii (herpetice, arbovirale etc.), cu poliomiелita ș.a. În Africa, unde există și alte virusuri asemănătoare virusului rabic, trebuie făcută și reacția de seroneutralizare, pentru că imunofluorescența dă reacții încrucișate între diverșii agenți din genul rhabdovirus.

La om, diagnosticul este dificil și, în caz de suspiciune, se recurge imediat la vaccinare și seroprofilaxie. În biopsiile din jurul plăgii sau pe amprente corneene se poate încerca diagnostic prin imunofluorescență. Diagnosticul în rabie trebuie să fie rapid, sensibil, specific și economic. Diagnosticul pus după apariția simptomelor clinice echivalează cu o condamnare la moarte.

Rabia la om

Rabia este o zoonoză. Omul se infectează prin mușcătura unui animal bolnav sau în incubație. Incubația variază între 10 zile și peste 6 luni (în medie 3-8 săptămâni), în funcție de caracterele plăgii mușcate și specia animalului rabil. În evoluția clinică a encefalomielitei rabice se descriu trei stadii: melancolic (primele 2-4 zile), de excitație (6-12 zile) și paralytic. Simptomele prodromale includ febră moderată, pierderea apetitului, anxietate, hiperestezie în jurul rănii mușcate. Simptomele propriu-zise constau în hiperexcitabilitate, aerofobie, fotofobie. Hiperexcitabilitatea simpaticului se traduce prin hiper-salivație, lăcrimare, transpirații. Contracturile musculare dureroase în cursul deglutiției determină simptomul caracteristic - hidrofobia. Moartea poate surveni abrupt prin stop cardiac, prin comă sau după o perioadă paralytică, prin insuficiență respiratorie.

Observații care încalcă dogma rabiei, totdeauna letale, se acumulează atât la om, cât și la animale. Există două cazuri umane

care au supraviețuit (cu sechele) grație protezării cardiorespiratorii în centre de terapie intensivă. La animale sunt rapoarte privind câini asimptomatici care au anticorpi și care secretă virusul o lungă perioadă de timp.

Patogenia infecției rabice este legată de diseminarea septinevritică a virusului. Virusul se replică inițial la nivelul plăgii mușcate, în celulele musculare striate, unde rămâne cantonat în cursul incubăției. Traversând joncțiunea neuromusculară, virusul se propagă axonal, centripet, către sistemul nervos central, în măduvă, apoi în creier, unde se replică abundent. Propagarea centrifugă, tot axonală, favorizează infecția organelor periferice: glande salivare, cornee, piele. Comportamentul noncitocid al virusului rabic în culturi se suprapune leziunilor constatate in vivo. Neuronoliza și neuronofagia sunt limitate, în contrast cu amploarea semnelor neurologice. Afectarea funcțiilor specializate ale anumitor grupe neuronale determină, în mare măsură, simptomatologia. Sinteza anticorpilor specifici debutează tardiv, ca o consecință a izolării SNC în raport cu celulele imunocompetente.

VACCINAREA ANTIRABICĂ

Alături de seroterapie, vaccinarea reprezintă singura metodă de tratament și profilaxie în rabie. Experimentele lui Pasteur, care constituie și azi un model pentru obținerea vaccinurilor atenuate, au demonstrat că propagarea intranevraxială a virusului rabic determină o modificare a caracterelor sale. Modificările vizează neurotropismul, incluziogeneza, forma clinică, infectivitatea pe cale subcutanată etc. Tulpina astfel modificată - virusul rabic fix - a constituit prima sursă a vaccinului antirabic preparat în țesut nervos adult de mamifer. Aceste vaccinuri, inactivate prin diferite metode: desicație, eter, căldură, acid formic, glicerină fenicată etc., aveau multe dezavantaje. În primul rând, imunogenitatea lor era scăzută, de unde necesitatea unor administrări repetate. În al doilea rând, antigenele din substrat sunt într-o proporție atât de însemnată în vaccin, încât riscul sensibilizării și al complicațiilor neurologice este foarte ridicat. În fine, schemele de imunizare presupun inoculări repetate, dureroase, greu acceptate. O reducere marcată a reacțiilor neuroalergice s-a obținut prin schimbarea substratului de cultivare a virusului rabic fix, recurgându-se la oul de rață embrionat sau creierul de șoarece nou-născut. Vaccinul preparat pe ou era slab imunogen, iar cel pe țesut nervos embrionar mai conținea încă neuroalergene în ciuda unei potențe mai bune.

Un progres remarcabil în studiul virusului rabic l-a constituit adaptarea la culturi de celule nonneurale. Exploatarea metodologiei de cultivare în culturi celulare a permis aprofundarea proprietăților virusului rabic și producția unui vaccin mai sigur și mai imunogen. O

atenție deosebită a primit vaccinul preparat în celule diploide umane (CDU). Aplicarea pe scară largă a acestui vaccin a probat superioritatea incomparabilă ca imunogenitate și reactogenitate în raport cu vaccinurile tradiționale. Vaccinul rabic preparat pe CDU este în uz de peste 25 de ani și incidența reacțiilor neuroalergice la aproximativ 2 milioane doze administrate a fost de numai 6 cazuri.

În perspectivă, se preconizează utilizarea altor substraturi celulare (mai ieftine și mai productive) pentru prepararea vaccinurilor antirabice. Astfel, au fost testate culturi primare de rinichi de hamster, fibroblaste de embrion de găină, culturi primare de rinichi de câine, celule diploide simiene sau culturi de fibroblaste de prepeliță japoneză. O alternativă promițătoare este utilizarea liniilor heteroploide care și-au probat absența oncogenității, cum ar fi linia VERO.

TRATAMENTUL RABIEI

Tratamentul rabiei comportă două alternative: tratamentul înaintea expunerii și după expunere. Schemele de administrare a vaccinului sunt redată în tabelul 21.II. Experiența asupra terapiei preexpunere cu vaccinuri preparate pe embrion de rață sau CDU poate fi sintetizată astfel: la aproximativ 8 000 de imunizări cu vaccinul pe embrion de rață se înregistrează 21 de reacții severe. Din acestea, 2/3 au apărut cu ocazia primei inoculări. Socotindu-se titrul minim protector de 1/16, numai 1/3 din subiecți au avut o astfel de seroconversie după 4 inoculări. În schimb, cu vaccinul pe CDU, practic, toți subiecții au atins titrul protector fără a se înregistra reacții adverse. Costul vaccinului pe CDU este însă un element restrictiv în folosirea lui exclusivă.

TABELUL 21.II

GHID PENTRU PROFILAXIA RABIEI DUPĂ EXPUNERE

<i>Specia animalului agresor</i>	<i>Starea animalului</i>	<i>Tratament preconizat</i>
Câine sau pisică	*sănătos rabid sau suspect necunoscută	*niciunul RIg și vaccin RIg și vaccin
Vulpe, lupi, lilieci etc.	**socotit rabid	RIg și vaccin
Bovine, iepuri, rozătoare	mușcătura acestor specii nu implică profilaxia antirabică decât în cazuri apreciate de specialiști ca suspecte.	

*disponibil încă 10 zile pentru observație, dacă animalul nu dezvoltă rabie nu se aplică nici un tratament;

**până la proba contrarie oferită de laborator.

Metodologia imunizării antirabice în scop profilactic sau terapeutic este indicată în tabelele 21.III-IV. Imunizarea în scop profilac-

tic se practică la persoanele cu risc profesional: îngrijitori de animale, personal de laborator, veterinari, vânători. Testarea răspunsului în anticorpi se face la două - trei săptămâni de la ultima inoculare. Imunizarea în scop terapeutic este însoțită de îngrijirea imediată a rănilor (spălare cu apă, săpun, detergenți anionici), administrare de Ig antirabice (Rlg). Regimul de imunizare se modifică în cazul în care persoana în cauză are antecedente de vaccinare antirabică.

TABELUL 21.III

METODOLOGIA IMUNIZĂRII ANTIRABICE ÎN SCOP PROFILACTIC

Felul vaccinului	Număr de doze	Cale de administrare	Intervale între doze	Observații
CDU	3	im	1-3 săptămâni	eventual rapel
embrion rață	3-4	sc	săptămânal	rapeluri lunare

TABELUL 21.IV

METODOLOGIA IMUNIZĂRII ANTIRABICE ÎN SCOP TERAPEUTIC (POSTEXPUNERE)

Vaccinul	Număr doze	Administrare	Intervale	Observații
CDU	5	im	zilele: 0,3,7,14,28	un rapel
embrion rață	23	sc	21 doze zilnice	rapeluri

Recomandările sunt numai un ghid. În aplicarea lor trebuie să se ia în considerare specia implicată (1), circumstanțele mușcăturii sau alte condiții de expunere (2), statusul vaccinal al animalului (3), prezența rabiei în zonă (4). Autoritățile locale de sănătate publică trebuie consultate dacă se pune problema necesității profilaxiei antirabice.

Vaccinarea antirabică a animalelor. Controlul bolii umane poate fi obținut numai prin controlul rabiei canine, indiferent de prezența paralelă a rabiei silvatică. În 90% din cazuri câinii sunt responsabili de infecția omului.

Vaccinarea, înregistrarea animalelor, restricțiile în mișcare (botniță și zgardă) și îndepărtarea câinilor vagabonzi sunt principii veterinare bine stabilite pentru controlul rabiei canine. În acest cadru, necesitatea unor vaccinuri ieftine, stabile și imunogene, este primordială. În unele zone (Australia, Marea Britanie, Noua Zeelandă, Taiwan), prin măsurile menționate și prin carantină, rabia a fost eradicată. În Eurasia și America trebuie depuse eforturi și pentru vaccinarea animalelor sălbatice. Un progres în această direcție l-a constituit vaccinarea orală a vulpilor. Vulpile au putut fi imunizate oral cu un vaccin viu atenuat introdus și absorbit prin mucoasa bucală și

faringe. Vaccinul a fost "prezentat" sub forma capetelor de pui infectate.

Rabia canină a fost eliminată în multe țări europene. Pericolul real ține de existența rabiei la vulpi și la alte animale sălbatice. Din peste 300 000 cazuri de rabie la animale diagnosticate în Europa după 1989, 75% au fost la vulpi, 2,3% la câini, 4,1% la pisici. Vaccinarea faunei sălbatice (mai ales vulpi, lupi) se practică în prezent pe cale orală cu un vaccin viu, recombinant, SAD dublu mutant. Se estimează că după trei campanii anuale succesive se poate obține eliminarea rabiei silvatică.

Concluzii

Rabia este viroza cu cea mai mare letalitate. Virusul sălbatic - tulpina de stradă - este neurotrop, cu afinitate pentru receptorul acetilcholinic. Diseminarea virusului de la poarta de intrare cutanată se face pe cale septinevritică. Clinic, rabia se manifestă ca encefalomielită. Pasajele repetate intracerebrale ale virusului rabic au dat naștere virusului rabic fix utilizabil în vaccin inactivat. Incubația lungă a bolii face ca vaccinarea asociată cu seroprofilaxia să fie o metodă terapeutică eficientă.

Sinteză

Lyssavirus - virusul rabic

Morfologia virionului rabic: virion în formă de glonț, cu capsidă și anvelopă cu proiecții glicoproteice 8 nm lungime. Diametrul 60-110 nm.

Genom ARNss linear, sens negativ, cu 12 kb cu un singur segment cu 5 gene.

Boli asociate: meningoencefalita rabică.

BIBLIOGRAFIE

- Pasteur L. Primul vaccin antirabic. C. R. Acad. Sci. 1885;765-774.
Negri A. Identificarea corpiilor Babeș Negri. Hyg. Infectionskr. 1903;43:507-528.
AthanasIU P et al. Structura electronoptică a virionului rabic. C. R. Acad. Sci. 1963;256:3219-3221.
Tordo N et al. Secvențierea completă a genomului rabic.
World Health Organization. WHO recommendations on rabies post-exposure treatment and the correct technique of intradermal immunization against rabies. Geneva: WHO/EMC/ZOO/96.6, 1-24, 1997. <http://www.who.int/emc-documents/rabies/html>
Koprowski H (eds.). Laboratory techniques in rabies, 4th ed., 1996, p. 157-74. Geneva: World Health Organization.

FILOVIRIDAE

De reținut:

Virusurile febrei hemoragice Ebola și Marburg sunt virusuri emergente, provenite din nișe ecologice mai puțin explorate de om, agenți ce pot determina epidemii de amploare și neașteptate. Filovirusurile determină febre hemoragice cu rată de letalitate ridicată (între 30-90%) la om și primat. Filovirusurile au genom ARN simplu spiralat nesegmentat.

Filovirusurile (din latinescul "filo" - fir, ce denotă aspectul filamentos al virionilor în microscopie electronică) au genom ARN simplu spiralat nesegmentat. Virionii au diametrul de 80 nm și lungimea variabilă (virusul febrei Ebola - 970 nm, virusul febrei Marburg - 790 nm). Morfologia virionului prezintă o nucleocapsidă, înconjurată de anvelopă cu proiecții transmembranare glicoproteice distincte antigenic pentru fiecare specie.

Schimbările climatice și de mediu (asanarea pădurilor tropicale, extinderea sistemelor de irigație primitive) deschid ecosisteme izolate anterior, determinând răspândirea agenților infecțioși de tipul filovirusurilor. Deși se crede că infecția cu filovirusuri este o zoonoză, rezervorul natural a fost identificat numai după investigarea a zeci de specii din jungla africană. Studii recente au arătat că lilieci insectivori pot susține replicarea și circulația unor concentrații mari de virus Ebola (tulpina Zair) fără simptomatologie aparentă. Spre deosebire de alte virusuri, filovirusurile nu par să se transmită în incubație, ci numai după debutul simptomatologiei. Modul inițial de infecție este necunoscut, dar transmiterea secundară se realizează pe mai multe căi:

- Contact direct interuman (cel mai probabil prin contactul cu sângele sau fluidele bolnavului).
- Percutanat, prin re folosirea acelor de seringă contaminate sau prin înțepături accidentale.
- Prin contact cu cadavrele în timpul pregătirilor de înmormântare.
- Prin contact direct cu primat nonhumanoide infectate sau contactul mucoasei bucale și conjunctivei cu picături infecțioase (exemplu, infecție experimental indusă la maimuță).

• Posibil pe cale sexuală (virusurile persistă în spermă timp de 3 luni de la remiterea simptomatologiei).

Filovirusurile determină febre hemoragice cu rată de letalitate ridicată (între 30-90%) la om și primat (maimuțe, nonhominoide, gorile, cimpanzei). Perioada de incubație variază între 4-10 zile și este urmată de instalarea bruscă a unui sindrom pseudogripal (febră, frison, cefalee, mialgii, anorexie), cu deteriorare rapidă și apariția manifestărilor hemoragice (diaree sanguinolentă, tulburări de coagulare, rash, peteșii). Sindromul de șoc survine la 6-9 zile de la debutul bolii. Constantele biologice arată limfopenie precocă cu neutropenie și trombocitopenie marcată ce explică tulburările de agregare plachetară, precum și creșterea transaminazelor serice, hiperproteinemia și proteinuria. Replicarea filovirusurilor se realizează în ficat, splină, ganglioni limfatici și plămâni. În aceste organe apar leziuni inflamatorii minime, dar este evidentă implicarea masivă a sistemului reticuloendotelial și a celui fagocitar monocito-macrofagic, precum și necroza severă în stadiile terminale ale infecției. Spre deosebire de alte febre hemoragice, în infecția cu filovirusuri coagularea intravasculară diseminată este o caracteristică importantă în patogenia bolii, alături de leziunile endoteliale și de creșterea permeabilității vasculare sub influența TNF alfa.

Agenții febrei hemoragice din această familie sunt:

- *virusul Ebola*, pentru care au fost descrise patru specii cu crossreactivitate antigenică variabilă: Zair (letalitate 90%), Sudan (letalitate 50%), Coasta de Fildeș (tulpini africane, letalitate indeterminată) și Reston (tulpini asiatice, aparent nepatogene pentru om);

- *virusul Marburg*, pentru care se cunosc două tulpini cu o diversitate genetică mai mică, și fără crossreactivitate serologică cu virusul Ebola.

Febra hemoragică Ebola

Febra hemoragică Ebola a fost descrisă în Africa Centrală și a captat atenția datorită ratei crescute de fatalitate (50-90%) asociată ultimelor epidemii. Datele asupra rezervorului natural al acestui virus sunt limitate. Maimuțele antropoide nu pot fi considerate rezervor natural, infecția cu virusul Ebola fiind letală și la această specie. Ebola pare a fi un pericol real de extincție a speciilor antropoide. Virusul a fost recunoscut și identificat în 1976, când două epidemii au izbucnit într-un interval scurt - una în Sudul Sudanului (284 de cazuri cu letalitate 53%) și cealaltă în nord-vestul Zairului (318 cazuri, cu o rată a mortalității 88%). Alte epidemii de mai mică amploare au survenit în 1977, 1978 în Zair și în 1979 în Sudan, din nou cu letalitate ridicată, în jur de 65%. A urmat în 1994 o epidemie la cimpanzeii sălbatici în Coasta de Fildeș, cu un singur caz uman - anatomopatologul care a autopsiat un cimpanzeu, și o altă în Gabon cu 49 de cazuri umane și letalitate 59%.

Transmiterea filovirusurilor se realizează prin contact fizic direct cu sânge sau secreții provenite de la o persoană infectată. Un exemplu în acest sens este epidemia de la Kikwit, Zair, din 1995. Cazul index a fost un localnic care s-a infectat în timp ce-și procura lemne de foc din junglă. Toți cei 13 membri ai familiei care l-au îngrijit sau au venit în contact cu cadavrul în timpul ceremoniei funerare s-au îmbolnăvit. Unul dintre aceștia, probabil cu incubajie prelungită, a fost internat o lună mai târziu cu diagnosticul de septicemie. Laborantul care a recoltat sânge pentru hemocultură s-a îmbolnăvit, fiind diagnosticat inițial cu apendicită acută și operat în două rânduri. Personalul medical ce a participat la intervențiile chirurgicale a fost victima celui de-al doilea val epidemic. Numărul total de cazuri a fost de 315, cu 77% mortalitate. În medie, timpul până la deces a fost de 9,6 zile, cu limite cuprinse între 0-34 de zile. Transmiterea intraspitalicească a filovirusurilor este frecventă și responsabilă de amplificarea epidemiilor. Se pare că transmiterea percutanată este asociată cu mortalitate mai mare. În epidemia inițială din 1976 din Zair, 26% din cazuri au fost infectate prin injecții cu ace contaminate, toate s-au soldat cu decesul pacienților.

Începând cu epidemia din 1995, numărul izbucnirilor epidemice în Africa Centrală a crescut. Două cazuri de febră hemoragică Ebola achiziționate profesional au fost raportate în 1996 în Africa de Sud. Este vorba de o persoană ce călătorea de la Gabon, unde venise în contact cu pacienți cu febră hemoragică Ebola și care a fost internată în Johannesburg și de asistentul medical care a îngrijit acest caz și care a decedat.

Cea mai recentă epidemie de febră hemoragică Ebola a fost raportată în sudul Sudanului, între martie și iulie 2004 când au fost înregistrate 17 cazuri cu 7 decese.

Singura tulpină de virus Ebola ce determină infecții asimptomatice la om este Reston. Aceasta a fost identificată în 1989, la maimuțe din specia *cynomologus* importate în Statele Unite din Filipine. Sute de cazuri de îmbolnăviri, cu mortalitate ridicată, au fost raportate la primatelor captive, dar fără infecții simptomatice umane, în ciuda faptului că 4 din îngrijitorii acestor animale au dezvoltat anticorpi specifici. Recent a fost testat un vaccin experimental la maimuțe cu rezultate bune.

Febră hemoragică Marburg

Originară tot din Africa sub-Sahariană, febra hemoragică Marburg are o prevalență mai scăzută comparativ cu Ebola și o rată a fatalității mai mică. Virusul Marburg a fost prima dată recunoscut în 1967, când a izbucnit o epidemie simultană în laboratoarele de culturi celulare din Germania (Marburg, Frankfurt) și Jugoslavia. Cazurile index au venit în contact cu țesuturi de maimuță verde

provenite din Uganda, utilizate pentru prepararea vaccinului antipliomicelitic. Rata fatalității în această epidemie a fost de 23%. După acest episod au mai fost raportate și alte izbucniri epidemice; toate având legătură cu Africa de Sud-Est. În ultima epidemie din Congo - 1988-2000 - o epidemie apărută în minele de aur, s-au identificat 72 de cazuri, iar rata de fatalitate a fost de 70%.

Transmiterea prin aerosoli nu a fost demonstrată în nici una din epidemiile de febră hemoragică Ebola, deși experimental infecția a fost transmisă astfel la maimuțe. Izolarea pacienților, utilizarea constantă și corectă a tehnicilor barieră și decontaminarea materialelor și instrumentarului sunt măsuri de protecție eficiente.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

În cazul febrei Marburg și Ebola produsul patologic optim pentru diagnostic este sângele, recoltat în timpul puseelor de febră. Virusurile se pot izola și din efuziunile lichidiene acumulate în țesuturi moi, lichid seminal și chiar lichid din camera anterioară a ochiului în fazele tardive de boală (conjunctivita apare frecvent în a 2-a săptămână de boală). Pentru febra Ebola se poate recolta în plus biopsia de tegument, de splină, ganglioni limfatici, ficat sau rinichi pentru izolare virală. La autopsie, produsele patologice trebuie recoltate doar de personal medical experimentat și instruit în privința bolilor infecțioase cu risc maxim de transmitere. Filovirusurile se izolează în laboratoare de interdicție maximă (Biosafety Level - BSL 4), din sânge și biopsii tisulare prin cultivare pe linii celulare de rinichi de maimuță la care apare un efect citopatic sincițial în maxim 7 zile. În izbucnirile epidemice se utilizează diagnosticul direct rapid prin evidențierea antigenelor virale în imunohistochimie pe țesuturi bioptice fixate în formol. Anticorpii sunt absenți în cazurile severe decedate rapid, astfel încât diagnosticul serologic este utilizat doar în convalescență. Tipul tulpinii virale se stabilește prin amplificarea genică postreverenșcriere.

În prezent sunt testate o serie de strategii de dezvoltare ale unui vaccin activ pentru filovirusuri:

- imunizarea cu ADN viral "gol", neîncapsadat, care induce imunitate umorală și celulară,
- o primă imunizare cu ADN viral, urmată de un booster cu vectori adenovirali ce codifică proteine filovirale, cu un răspuns imun mai viguros decât fiecare din cele două alternative utilizate separat,
- vectori vaccinia recombinanți, dar cu posibilitatea dezvoltării unui răspuns imun mai slab, datorită sintezei unui număr disproporționat de mare de proteine ale virusului vaccinia în celula gazdă,

și cu dezavantajul unor reacții adverse severe la persoanele imuno-compromise.

Până acum, nici unul din vaccinurile candidat nu a demonstrat protecție împotriva infecției la primate cu doze peste pragul de 1 000 PFU, similare celor la care sunt expuse persoanele în urma infecției prin ace contaminate. Cercetările sunt oarecum limitate de numărul redus de laboratoare BSL 4 existente în lume.

POTENȚIALUL BIOTERORIST

Centrul pentru Controlul și Prevenirea Bolilor Infecțioase CDC, Atlanta, din S.U.A. a clasificat agenții infecțioși cu potențial bioterorist în trei mari clase, după următoarele criterii:

- impactul asupra sănătății publice prin prisma ratei morbidității și mortalității;

- potențialul de diseminare în masă datorat stabilității agentului infecțios în mediu, accesibilității unor capacități de producție pe scară largă, răspândirii prin transmitere secundară interumană;

- perturbarea funcționării normale a societății, datorită panicii create;

- necesitatea unor acțiuni speciale pentru creșterea capacității de supraveghere și diagnostic, precum și pentru asigurarea unui stoc important de medicamente și vaccinuri.

Agenții încadrați în *clasa A* prezintă risc maxim pentru securitatea națională și internațională, au rată de morbiditate și mortalitate înaltă, pot fi diseminați prin aerosoli. Aici sunt incluse următoarele bacterii și virusuri:

- *Bacillus anthracis* - agentul etiologic al antraxului.

- *Yersinia pestis* - agentul etiologic al ciumei.

- *Toxina din Clostridium botulinum* - agentul etiologic al botu-

lismului.

- *Francisella tularensis* - agentul etiologic al tularemiei.

- *Virusul variolic (smallpox)* - agentul etiologic al variolei major.

- *Virusuri ale febrei hemoragice - filovirusuri* (virusurile febrei hemoragice Ebola sau Marburg) și *arenavirusuri* (febrele Lassa, Machupo etc.).

Datorită potențialului important de diseminare a majorității agenților utilizați în scop bioterorist și progresiei rapide a bolii, răspunsul autorităților de sănătate publică trebuie să se bazeze în primul rând pe recunoașterea clinică a sindroamelor cu risc (tabelul 22.1) și nu trebuie amânat până la obținerea confirmării de laborator.

TABELUL 22.1

PRINCIPALELE SINDROAME DETERMINATE DE AGENȚI CU POTENȚIAL BIOTERORIST

<i>Sindrom</i>	<i>Incubație</i>	<i>Evoluție</i>	<i>Mortalitate</i>	<i>Tratament/Profilaxie</i>
Antrax inhalatoional	1-6 zile	3-15 zile	99-100 %	Vaccin, Antibiotice (ciprofloxacina, doxicilină)
Botulism	6 ore-10 zile	24-72 ore	5-10%	Ser antitoxinic polivalent (A-E), Antibiotice
Tularemie	3-5 zile (1-21 zile)	14 zile	~33% fără tratament <4% sub tratament	Vaccin viu atenuat
Ciuma pulmonară	2-3 zile	1-6 zile	40-70% fără tratament 5% sub tratament	Vaccin inactivat pt. forma bubonică, Antibiotice
Variola	7-17 zile	4 săptăm.	< 1% formă minoră 20-55% formă majoră	Vaccin
Febre hemoragice Ebola, Marburg	4-21 zile	7-16 zile	53-88 %	Suportiv, Ribavirină intravenos

BIBLIOGRAFIE

- Borio L, Inglesby T, Peters CJ et al. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. JAMA 2002;287:2391-405.
- Jahrling PB. Filoviruses and arenaviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al (eds.), Manual of clinical microbiology, ed. 7. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1999, p. 1125-36.
- Bwaka MA, Bonnet MJ, Calain P et al. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. J. Infect. Dis. 1999;179(suppl 1):S1-S7.

RETROVIRIDAE

De reținut:

Virion sferic, 80-90 nm diametru, anvelopat.

Genom ARNss, linear, prezent în două copii identice, uneori defectiv, poate purta oncogene. Caractere importante: reverstranscriptaza virală copiază ARN genomic viral în ADN proviral, care se poate integra în genomul celulei gazdă. Infecția nu lizează celula infectată, dar poate activa expresia unor oncogene celulare. Provirusul rămâne permanent asociat celulei gazdă, însă se exprimă numai ocazional.

Istoric. În 1911, Peyton Rous a descoperit primul retrovirus și totodată primul virus oncogen la păsări: virusul sarcomului Rous (VSR). Observațiile făcute de autor (recompensate cu premiul Nobel după mai bine de 60 de ani) erau cu totul remarcabile: sarcomul Rous transplantat în serie la animale sănătoase devine din ce în ce mai proliferant, iar extractul acelușar este, de asemenea, tumorigen. Ulterior, studiul altor retrovirusuri (aviare, murine) a condus la descoperiri fundamentale pentru biologia moleculară și oncologie: reverstranscriptaza (Temin și Mizutani, 1970, și, simultan, Baltimore) și primul oncogen (Stehelin, Varmus, Bishop și Vogt, 1976). Implicațiile acestor descoperiri sunt notorii: tehnologia ADN recombinant, blocarea sau activarea genelor prin mutageneză dirijată in vivo, terapia genică utilizând ca vectori de gene secvențe retrovirale.

CLASIFICARE

Retrovirusurile sunt paraziți celulari evoluți și foarte specializați. Genomul lor ARN este utilizat pentru codificarea unor proteine structurale și reglatoare. De asemenea, reverstranscriptaza virală (RT) poate sintetiza copia ADN a acestui genom - provirusul - care se poate integra în genomul celulei gazdă prin mijlocirea unor secvențe marginale numite LTR (*long terminal repeats*).

Următoarele clasificări ale retrovirusurilor sunt de reținut:

(a) **după implicațiile clinice**, în trei subfamiii:

- **Oncovirinae** (grupează virusuri oncogene și neoncogene).
- **Lentivirinae** (grupează agenți ai unor afecțiuni lent degenerative ale SNC).

- **Spumavirinae** (produc infecții persistente, asimptomatice);

(b) **după particularitățile replicative in vivo și in vitro: virusuri oncogene rapide și lente**, ale căror caracteristici sunt rezumate în tabelul 23.I.

TABELUL 23.I

DIFERENȚE ÎNTRE ONCOVIRUSURILE RAPIDE ȘI LENTE

Caracteristica	Oncovirusuri rapide	Oncovirusuri lente
Oncogenitate	pronunțată	redușă
Latență	1-2 săptămâni	câteva luni
Replicare	defectivă	nondefectivă
Transformare in vitro	da	nu
Tumori in vivo	policlonale	mono, oligoclonale

Virusul sarcomului Rous este unic între oncovirusuri, fiind rapid oncogen, dar nondefectiv;

(c) **după prezența receptorilor membranali la suprafața celulei țintă:**

- **Ecotrope** - care se replică numai în celule provenind de la specia de la care au fost izolate.

- **Xenotrope** - care se replică numai în celulele altei specii decât cea de origine.

- **Amfotrope** - care se replică în celulele speciilor homologe și heterologe.

Clasificarea retrovirusurilor umane. Retrovirusurile umane au fost descoperite în urma studiilor intense vizând etiologia virală a unor leucemii și limfoame. Denumirea lor este abreviată prin sigla HTLV (*human T-cells leukemia viruses*). Inițial au fost descrise 3 tipuri:

- **HTLV I** - asociat cu leucemii/limfoame cu celule T și, ulterior, cu alte entități clinice (tabelul 23.II).

- **HTLV II** - izolat în sindroame hematologice rare (leucemie cu celule în arici - "*hairy cells*").

- **HTLV III** - agentul SIDA/AIDS, cunoscut în literatura franceză ca **LAV** (*lymphadenopathy associated virus*) dar, în prezent, etichetat ca **HIV** (*human immunodeficiency virus*) și clasificat ca lentivirus.

HTLV I și II se disting prin existența unei gene - tax - care asigură transactivarea unor gene celulare, cum sunt cele pentru sinteza IL-2 și a receptorului pentru IL-2. Această genă pare a fi cheia

explicației oncogenezei în cazul HTLV I și II, unde teoria oncogenelor virale și a mecanismului de inserție/inducție nu au fost argumentate.

TABELUL 23.II

FORME CLINICE ASOCIATE CU ETIOLOGIA HTLV I

Denumirea bolii	Sinonime	Sigla engleză
Parapareză tropicală spastică	Neuropatia jamaicană	TSP
Leucemii/limfoame cu celule T adulte	Mielopatia HTLV I	ALT
Alte boli rare	Dermatita infecțioasă jamaicană, Endocrinopatie asemănătoare sindromului Sjögren Polimiozite, artropatii	

În ciuda faptului că HTLV I a fost primul retrovirus uman izolat, semnificația lui medicală a fost umbrită de notorietatea HIV. Pentru o scurtă informare a celor interesați de patologia comparată, enumerăm la sfârșitul capitoului cele 5 grupe de virusuri, nu foarte înrudite, dar plasate toate în subfamilia oncovirinae.

REPLICAREA RETROVIRUSURILOR

Replicarea retrovirusurilor constă în parcurgerea următoarelor etape: atașarea la receptori și penetrarea prin fuziune, reverstranscrierea genomului în ADNc proviral, tranzitarea către nucleul celulei și integrarea în genomul gazdei. Integrarea se face mai mult sau mai puțin la întâmplare și este mediată de existența secvențelor terminale repetate - LTR. Sinteza virionilor progeneri debutează cu sinteza ARN viral de către polimeraza celulară II, utilizând ca matriță provirusul integrat. Acest ARN progen servește și pentru transcrierea proteinelor structurale virale și pentru sinteza enzimelor de procesare, asigurând semnalele indispensabile asamblării virionilor maturi și eliberării lor prin înmugurire. De reținut că, odată integrat, provirusul este stabil și se comportă identic cu genomul celular. Replicarea provirusului nu are nici un fel de consecințe asupra celulei care se divide și funcționează absolut normal, cu singura excepție că produce continuu noi virioni.

CLINICĂ

HTLV I determină infecții cronice (vezi tabelul 23.II) în focare geografice endemice în Japonia, Brazilia și în regiunea insulelor Caraibe. Au fost descrise determinări hematologice la pacienți români

care nu au călătorit în zonele endemice, dar au în antecedente transfuzii sanguine. Spre deosebire de variabilitatea genomică excesivă a HIV, HTLV I prezintă o stabilitate genomică ce permite corelarea secvențelor genomice cu originea geografică a izolatelor. Pentru izolatele românești este caracteristică apropierea de secvențele carabiene.

TRANSFORMARE

Retrovirusurile se împart în două categorii:

- transformante in vitro și rapid oncogene in vivo (săptămâni);
- nontransformante și lent oncogene (luni).

Retrovirusurile rapid oncogene induc tumori policlonale datorită expresiei unor oncogene virale (vezi capitolul cancer și virusuri). Oncogenele virale reprezintă versiunea oncogenă a unor gene celulare normale. Retrovirusurile lent oncogene induc tumori mono sau oligoclonale datorită mutațiilor cauzate de inserția provirusului retroviral în genomul gazdei (și nu datorită expresiei unor oncogene).

Fapt unic pentru virusurile animale, retrovirusurile au capacitatea de a încorpora fragmente ale genomului celular (numite **c-onc** sau **protooncogene**), de a le modifica structura și de a le face capabile să transforme celulele infectate. Peste 30 de oncogene au fost descoperite la retrovirusuri, iar studiul lor în raport cu corespondența celulară a adus noi clarificări asupra carcinogenezei.

Toate oncogenele retrovirale sunt deci recent derivate din genomul celulei gazdă. Nu există dovezi că retrovirusurile care le poartă (transformante) se transmit eficient orizontal, ceea ce sugerează că ele nici nu sunt agenți infecțioși naturali. Mai mult, ele trebuie considerate ca aberații rare, relevate în laborator, care s-ar pierde în condiții naturale împreună cu animalul la care au apărut. Concret, cea mai bună sursă pentru descoperirea de noi oncogene este reprezentată de populațiile de animale în care infecțiile cu virusuri leucemice sunt frecvente: puii de găină crescuți industrial pentru carne, pisicile purtătoare de tumori etc.

Există câteva diferențe importante între oncogenele virale și ancesorii lor celulari (c-onc):

- conțin numai o parte din secvența genei c-onc;
- conțin o versiune prelucrată a genei c-onc cu majoritatea intronilor excluși;
- sunt separate de promotorii celulari și intră sub incidența acțiunii reglatorii a LTR virale;
- multe oncogene virale au suferit deleții sau mutații care terează produsul proteic în comparație cu produsul c-onc;
- produsul oncogenelor virale este adesea exprimat fuzionat cu proteine virale.

VIRUSURI ENDOGENE

Un alt fapt unic, prezent numai la retrovirusuri, este evidențierea lor ca elemente incluse în linia germinală, transmise mendelian la mai toate vertebratele. Se estimează că 5-10% din genomul de mamifer este alcătuit din elemente introduse prin reverstranscriere. Aproximativ 10% dintre ele pot fi regăsite în structura unor retrovirusuri, sunt deci provirusuri; restul sunt retroelemente asemănătoare transpozomilor de la plante sau fungi, adică virusuri "în evoluție", cărora le lipsește stadiul extracelular, virional. Prezența lor are atât efecte benefice, cât și patogenice asupra gazdei. Spre exemplu, virusurile endogene adaptate la parazitarea liniei germinale pot conferi acestuia rezistență la infecția cu alte virusuri exogene care utilizează același receptor sau pot induce toleranță imunologică, minimalizând efecte imunopatice. Efectele patogenice sunt exemplificate de apariția unor cancere la animale care găzduiesc virusuri endogene: limfoame la șoarecii AKR sau carcinom mamar la alte linii de șoareci.

În concluzie, majoritatea retrovirusurilor care conțin oncogene, deși sunt transformante, nu se replică productiv. Replicarea productivă are loc numai în condițiile infecției duble cu corespondentul care nu a achiziționat oncogene celulare și care are rol de "helper". Defectivitatea virusurilor transformante se explică prin înlocuirea de către oncogene a unei părți mai mici sau mai mari din genom, însă esențială pentru sinteza proteinelor structurale virale. Oncogenele nu au rol în replicare. În contrast marcat, la virusurile oncogene ADN (herpes, papilloma), genele transformante virale sunt gene esențiale și pentru replicarea virală.

XENOTRANSPLANTAREA ȘI INFECȚIILE RETROVIRALE

Disponibilitatea organelor umane pentru transplant este limitată, încât studiile asupra posibilității (și riscurilor) utilizării transplantului de organe de la animal (xenotransplantare) iau amploare. Principalul impediment în xenotransplantare este reacția de hiperrejecție acută. Oamenii au anticorpi anti-alfa galactoză care, în contact cu organe de la specii diferite, antrenează activarea complementului și distrugerea endotelului capilarelor în grefon. Acest fapt a putut fi controlat prin producerea de animale deficiente în CD55 (*decay accelerating factor*) și receptor pentru enterovirusuri.

Posibilitatea ca retrovirusuri porcine (PERV) să treacă bariera de specie și să infecteze oamenii (xenosism) rămâne o incertitudine

pe termen lung a xenogrefelor de la porc. PERV sunt integrate în genom la porc și pot infecta, in vitro, celule umane. Urmările potențial nedorite ale infecției cu PERV sunt:

- persistența PERV la subiecții cu xenotransplant;
- replicarea lor în celule umane,
- diseminarea de la nivelul grefei,
- interacțiunea cu alte virusuri umane și activarea ultimelor.

Posibile căi de soluționare ale problemei sunt:

- producerea de vaccinuri anti-PERV;
- tratamentul cu antiretrovirale, care sunt însă imunosupresoare;
- prevenirea microhimerismului, care poate activa replicarea

PERV.

Sinteză

Familia retroviridae cuprinde următoarele genuri:

Alpharetrovirus: la păsări - exemplu virusul sarcomului Rous și multe alte retrovirusuri oncogene la păsări.

Betaretrovirus - virusul sarcomului Bittner la șoarece și alte virusuri oncogene.

Gammaretrovirus - virusuri oncogene la alte mamifere (feline, murine etc.).

Deltaretrovirus - virusurile leucemiilor la bovine și HTLV I și II la om.

Epsilonretrovirus - virusuri oncogene la pești walleye.

Lentivirus - HIV.

Spumavirus - virusuri spumante la bovine, ecvine, pisică etc.

BIBLIOGRAFIE

Barre-Sinoussi F et al. Science 1983;220:868-871.

Gallo RC et al. Descoperirea HIV-1 (Virusul Imunodeficienței umane). Science 1984;224:500-503

Kanki PJ et al. Descoperirea HIV 2. Science 1985;228:1199-1201.

Barin F et al. Descoperirea SIV (Virusul Imunodeficienței la simiene). Lancet 1985;ii: 1387-89.

Pedersen NV et al. Descoperirea FIV (Virusul Imunodeficienței la feline). Science 1987; 35:790-793.

VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE (HIV/SIDA)

De reținut:

HIV aparține familiei retroviridae subfamilia lentivirinae. Majoritatea infecțiilor actuale sunt datorate HIV 1, mai virulent și mai îndepărtat de ancestorul simian SIV (virusul imunodeficienței simiene). Infecția HIV poate fi considerată inițial o zoonoză în care agentul etiologic simian s-a adaptat treptat la om. HIV 2 este un tip viral mai atenuat și mai apropiat filogenetic de SIV decât HIV 1. Principalele caracteristici ale infecției HIV la om sunt: replicare virală masivă în țesutul limfoid, depleția limfocitelor T CD4⁺ infectate, hiperreactivitate imună generalizată. Descoperirea antiretroviralilor a transformat infecția HIV dintr-o boală rapid fatală într-o infecție cronică cu o lungă perioadă de stabilizare.

Sindromul de imunodeficit dobândit (SIDA sau AIDS, din engleză) este o suferință cronică datorată infecției cu virusul imunodeficienței umane (HIV). Boala trebuie înțeleasă în ansamblul său incluzând patru stadii: infecția primară, stadiul asimptomatic, ARC (*AIDS related complex*) și SIDA. SIDA a provocat cea mai mare criză în sănătatea publică, comparabilă numai cu epidemiile de ciumă din Evul Mediu. În 2005 s-au înregistrat 4,1 milioane de cazuri noi și 2,8 milioane de decese la nivel global. Răspunsul social la această criză trebuie să fie complex: tratament și îngrijire, dar și educație și prevenție

HIV aparține familiei retroviridae subfamilia lentivirinae.

Majoritatea infecțiilor sunt datorate HIV 1, mai virulent și mai îndepărtat de ancestorul simian SIV (virusul imunodeficienței simiene). Infecția HIV poate fi considerată inițial o zoonoză, în care agentul etiologic simian s-a adaptat treptat la om. HIV 2 este un tip viral mai atenuat și mai apropiat filogenetic de SIV decât HIV 1.

Analiza filogenetică a celor mai vechi secvențe genomice HIV recuperate din probe stocate din 1959 (din Congo) indică diversifi-

care serotipurilor HIV 1 actuale de la un singur ancestor. Primele subtipuri diversificate par să fi fost B (nord-american) și D (unul din subtipurile vest-africane) care ar fi apărut în anii '40-'50.

De la traversarea barierei de specie de la cimpanzeu la om (cu aproximativ 7 decenii în urmă), HIV 1 s-a diversificat pe măsură ce pandemia umană (erau peste 40 milioane de cazuri în 2001) a evoluat. În prezent circulă 11 subtipuri notate de la A la J (grupul principal "main" - M). În afara acestora există cel puțin 13 **forme circulante recombinante** (CRF), rezultate probabil din suprainfecții ale unui subiect cu mai multe subtipuri, succesiv. În România și în țările vecine afectate (Moldova, Ucraina) circulă subtipurile F, B (principalul tip vest-european), C și H. Identificarea subtipurilor are implicații privind lămurirea căilor de transmitere, evoluția rezistenței la medicamente și perspectiva preparării unui vaccin.

MORFOLOGIA VIRIONULUI (fig. 24.1)

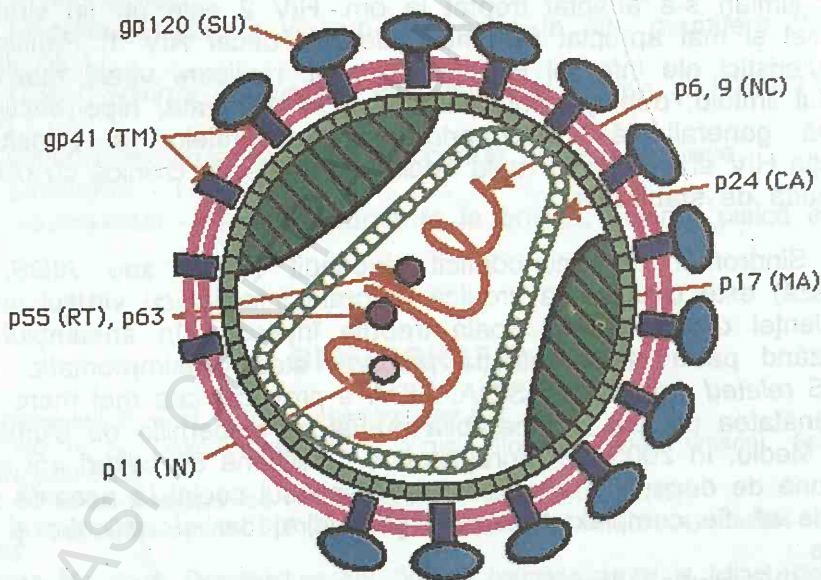


Fig. 24.1. Morfologia virionului cuprinde două copii identice de ARN genomic cu molecule atașate de revertranscriptază (p55-RT), capsida (multiple copii ale proteinei p24) și anvelopa, cu două componente ale proiecțiilor superficiale gp120 și gp41 (vezi textul pentru celelalte componente).

HIV este un virus ARNss cu anvelopă pe care sunt prezente numeroase copii ale **glicoproteinei superficiale gp120** care cuplează principalul **receptor CD4** situat pe:

- limfocitele T helper,
- macrofage,
- celule foliculare dendritice (CFD).

Genomul conține două copii pe care sunt dispuse următoarele trei categorii de gene virale:

- **gene structurale:**

gag (de la "antigen de grup") care codifică:

- p17 - proteina matrice (MA),
- p24 - proteina capsidară (CA),
- p6, 9 - nucleocapsida (NC);

pol (de la "polimerază") care codifică:

- p32 - proteaza (PR),
- p55 - reverstrascriptaza (RT),
- p11 - integraza (IN);

env (de la "anvelopă") care codifică:

- gp160 - glicoproteina precursor,
- gp120 - glicoproteina de suprafață,
- gp41 - glicoproteina transmembranară;

- **gene reglatorii:**

rev - activatoare a producției de virus,

nef - reglatoare negativă a producției de virus,

tat - transactivatoare, implicată în relația cu factori de transcriere celulari;

- **gene de maturare** (neesențiale pentru maturarea in vitro, în culturi de celule, dar importante pentru patogenitate in vivo):

vif - promovează infectivitatea virionilor,

vpu - crește proporția particulelor virale extracelulare,

vpr/vpx - genă accesorie cu activitate neprecizată.

Virionul HIV prezintă două copii identice ARNss cu polaritate pozitivă a genomului. Capsida și anvelopa conțin multiple proteine structurale. Antigenul capsidar **p24** este util în diagnostic în **feresta serologică**. Antigenul superficial din anvelopă provine din precursorul glicoproteic (gp) gp160 care se clivează în **gp120** (superficială, care leagă CD4) și **gp41** (transmembranară) care participă la fuziune și la cuplarea coreceptorilor.

Virionii HIV se atașează prin glicoproteina gp120 la celulele care au receptori CD4: limfocite T, monocite, CFD, dar și alte celule, cum sunt macrofagele fixe (Kupffer, celule endoteliale, celule gliale etc.). Internalizarea HIV se face prin **fuziunea** anvelopei cu membrana celulară, fenomen determinat de gp41. Efectul citopatic al HIV este **sincizant**.

Proteinele codificate de genele structurale pot fi identificate de benzile Western blot (fig. 24.2).



Fig. 24.2. Efect citopatic sinciizant al HIV pe celule limfoblastoide umane.

CORECEPTORII VIRALI ȘI REZISTENȚA LA INFECȚIE

Coreceptorii sunt structuri la suprafața membranei celulare care funcționează pentru adsorbția și internalizarea virionilor. De exemplu, pentru HIV s-au descris nu mai puțin de 10 coreceptori - nu numai proteine, ci și glicolipide. CD4 este receptorul principal pentru HIV 1, însă în evoluția virusului el reprezintă o achiziție mai recentă decât utilizarea coreceptorilor. Odată cu creșterea virulenței, HIV 1 s-a adaptat la un receptor (CD4) critic pentru economia organismului și pentru funcția celulelor care-l poartă. Coreceptorii - atunci când sunt blocați - sunt structuri care nu afectează atât de brutal (și ireversibil) funcția celulelor, precum receptorii CD4. Ancestorul HIV, virusul simian SIV, se poate internaliza în limfocite CD4 negative utilizând numai coreceptorii (CCR5). Descoperirea coreceptorilor este într-un fel arheologie virală și poate aduce informații indispensabile pentru înțelegerea evoluției virusurilor. Totodată, densitatea coreceptorilor condiționează tropismul unor tulpini virale și rapiditatea procesului infecțios.

Tropismul celular al izolatelor HIV variază după cum ne raportăm la izolate din infecția primară sau la izolatele din fazele tardive ale bolii.

În infecția primară predomină izolate **macrofagotrope** (M-trop) și **nonsincițizante** (NSI). Aceste izolate utilizează coreceptorul pentru beta-chemokine notat CCR5 (fig. 24.3).

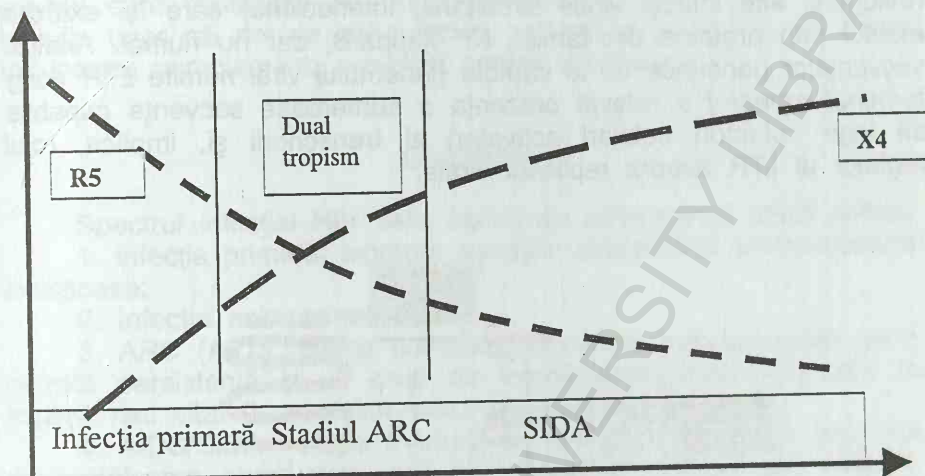


Fig. 24.3. Istoria naturală a infecției HIV și prevalența izolatelor în funcție de tropism. Tulpinile cu tropism dual R5/X4 apar mai ales sub tratament și infectează limfocitele de memorie. Emergența tulpinilor SI (tropism pentru linii limfoblastoide) marchează scăderea abruptă a numărului de limfocite CD4 pozitive.

În infecția tardivă izolatele sunt cu tropism pentru limfocite (T-trope) și sincițizante (SI). Aceste tulpini nu sunt influențate de beta-chemokine, ele utilizează drept coreceptor fusina - CXCR4 (un receptor care semnalează prin proteinele G). Moleculele de fusină leagă glicoproteina transmembranală a anvelopei HIV: gp41.

CICLUL REPLICATIV

HIV conține ARNss (polaritate pozitivă) ca material genomic, iar conversia acestuia în **ADN proviral** prin reverstranscriere este o etapă caracteristică pentru ciclul replicativ al tuturor retrovirusurilor. Genomul "diploid" formează o structură încolăcită care poate folosi ca matrită alternativ cele două copii identice ale genomului. Această particularitate este una din sursele de variabilitate ale HIV. **RT-aza** sintetizează inițial o singură spirală ADN pe matrită ARN viral iar apoi și spira ADN complementară. ADN-HIV dublu spiralat este translocat în nucleul celulei infectate, unde se inseră în genomul gazdei prin acțiunea integrazei - o altă enzimă a HIV. Integrarea are ca urmare dezvoltarea unei infecții lente în timpul căreia secvențele ADN provirale nu pot fi deosebite de ADN celular, urmând aceleași reguli de traducere a

informației genetice. Principalele medicamente antiretrovirale acționează asupra RT-azei, proteazelor, inhibării fuziunii.

Activarea ADN-HIV latent este urmarea acțiunii unor cofactori (mitogeni, alte infecții virale simultane, interleukine) care își exercită efectul prin proteine din familia NF kappa/B, dar nu numai. Analiza secvențelor genomice de la capetele genomului viral numite *LTR* (*long terminal repeats*) a relevat prezența a numeroase secvențe capabile să lege cofactori celulari activatori ai transcrierii și, implicit, rolul regulator al LTR asupra replicării virale.

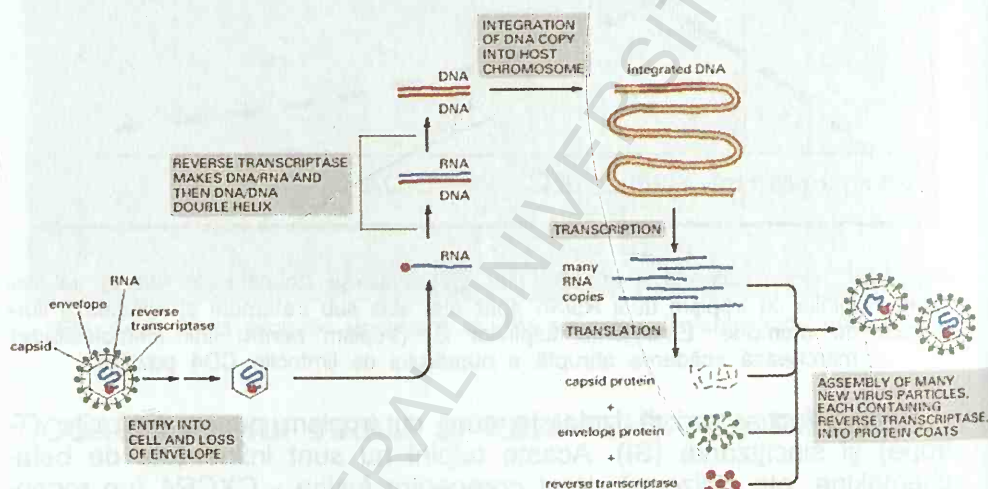


Fig. 24.4. Ciclul replicativ HIV.

Ciclul replicativ HIV constă în parcurgerea următoarelor etape (fig. 24.4):

- Atașarea (adsorbția) la receptori, internalizarea prin fuziune și decapsidarea (Entry în figură).

- Reverstranscrierea genomului ARN în ADNc proviral și sinteza dublului helix ADN/ADN.

- Tranzitarea către nucleul celulei și integrarea în genomul gazdei.

- Integrarea se face mai mult sau mai puțin la întâmplare și este mediată de existența secvențelor terminale repetate - LTR.

- Sinteza virionilor progeni debutează cu sinteza ARN viral de către polimeraza celulară II utilizând ca matrice provirusul integrat (*Transcription* în figură).

- Acest ARN progen servește și pentru traducerea proteinelor structurale virale (*Translation* în figură) și pentru sinteza enzimelor lor de procesare (proteaze), asigurând semnalele indispensabile asamblării virionilor maturi și eliberării prin înmugurire. De reținut că, odată integrat, provirusul este stabil și se comportă identic cu genomul celular.

Dintre virusurile care activează HIV latent în cazul coinfectiei menționăm virusul citomegalic, virusurile herpes 6, 7 și 8, virusurile HTLV. De regulă, aceste virusuri induc expresia unor neoreceptori celulari care facilitează nu numai infecția productivă a HIV, dar și apariția unor căi noi de internalizare a virusului (receptori Fc, receptori pentru complement, receptori pentru interleukina 2).

CLINICĂ

Spectrul infecției HIV este definit de următoarele stadii clinice:

1. infecția primară, sindrom pasager asemănător mononucleozei infecțioase;

2. infecția asimptomatică;

3. ARC (*AIDS related complex*) definit de limfadenopatie generalizată persistentă și un grup de infecții oportuniste (IO) care nu implică risc vital (leucoplakia orală păroasă, candidiaze);

4. AIDS/SIDA - etapă marcată de evoluția unor IO cu risc vital, de neoplasme oportuniste sau de manifestări directe ale citopato-genității HIV care, de asemenea, amenință viața (exemplu: encefalopatia HIV).

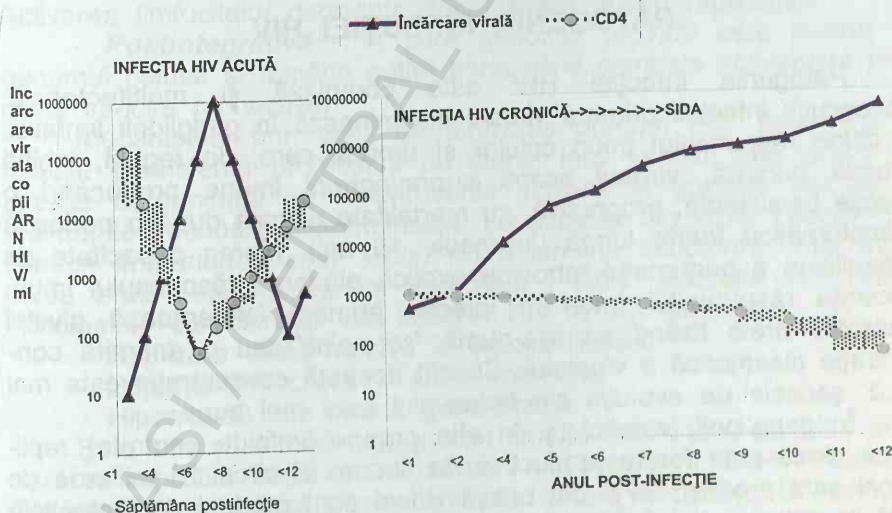


Fig. 24.5. Evoluția celor doi markeri importanți în infecția HIV: încărcarea virală (marker virusologic) și numărul limfocitelor CD4 (marker imunologic). În infecția primară, răspunsul imun reușește să controleze replicarea virală. În faza finală, cei doi markeri evoluează divergent: imunosupresia nu mai controlează încărcarea virală.

După infecția acută, se stabilește echilibrul între replicarea virală și răspunsul imun, fapt reflectat de absența simptomelor și de valori

normale ale numărului de limfocite CD4, chiar în absența oricărui tratament (fig. 24.5). Această perioadă de latență clinică poate dura și 10 ani. La sfârșitul latenței, epuizarea capacității de refacere a limfocitelor se reflectă, pe de o parte, în scăderea numărului CD4 și, pe de altă parte, în apariția simptomelor. Clasificarea clinică a infecției cronice urmează 2 axe: clasificare în raport cu simptomele și clasificare imunologică, după numărul limfocitelor CD4. După primul criteriu au fost stabilite 3 categorii:

(A) - infecția acută și infecția HIV asimptomatică sau numai cu limfadenopatie persistentă generalizată.

(B) - simptome benigne, fără risc vital.

(C) - simptome severe și infecții oportuniste cu risc vital.

Categoriile imunologice se desemnează prin cifre:

Categoria 1: >500 CD4⁺ T-cells/ μ l.

Categoria 2: 200-499 CD4⁺ T-cells/ μ l.

Categoria 3: <200 CD4⁺ T-cells/ μ l.

Categoriile sunt determinate de cel mai mic număr înregistrat în evoluție și nu de numărul determinat cel mai recent. Dacă un bolnav a avut o numărătoare sub 200, el rămâne în categoria 3, chiar dacă între timp a înregistrat valori mai mari în urma tratamentului.

PATOGENIA INFECȚIEI HIV

Patogenia infecției HIV este complexă și multifactorială. Consecutiv infecției primare virusul diseminează în ganglionii limfatici. În ciuda răspunsului imun celular și umoral care, de regulă, inhibă viremia primară, virusul scapă supravegherii imune producând o infecție persistentă, progresivă, cu mortalitate ridicată după o perioadă asimptomatică foarte lungă (în medie 10 ani). Marea capacitate de variabilitate a genomului retroviral explică eludarea răspunsului imun. Eficiența răspunsului imun în infecția primară influențează nivelul încărcării virale fixând un așa-numit "set-point" sau o anumită concentrație plasmatică a virusului. Cu cât această concentrație este mai mică, șansele de evoluție ale bolnavului sunt mai bune.

În ganglionii limfatici (și în alte organe limfoide centrale) replicarea virală este foarte productivă: în fiecare zi circa 10 miliarde de virioni sunt produși. 99% din acești virioni sunt produși de limfocitele CD4 în urma unei infecții litice (semnificația lor este de numai 1,6 zile). Efortul sistemului imun de a balansa citopatogenitatea virusului se traduce prin diviziunea rapidă a precursorilor limfocitari. Mult timp numărul limfocitelor CD4 în periferie rămâne constant ($1\,000$ cel/ mm^3), însă declinul acestui număr precedă intrarea bolnavului în stadiul simptomatic. Un număr de 500 de limfocite CD4/ mm^3 și o încărcare virală de circa 10 000 de copii ARN/ml sunt criterii de inițiere a te-

rapiei antivirale. Balanța dintre factorii inductori și supresori ai replicării virale influențează cursul bolii.

Definirea **supraviețuitorilor de lungă durată** ("longsurvivor-i" sau bolnavi "de elită") se face în raport cu următoarele criterii:

- infecție HIV serologic demonstrată, mai veche de 7 ani la adulți sau mai veche de 5 ani la copii;

- număr normal al limfocitelor CD4 pozitive (peste 600/ml);

- absența oricăror simptome chiar fără tratament antiretroviral.

Trei posibile explicații pentru rezistența prelungită a acestor bolnavi la infecție au fost avansate:

- limfocitele lor periferice sunt mai puțin susceptibile la HIV (i);

- răspunsul lor imun este mai puternic (ii);

- tulpinile virale izolate de la acești subiecți sunt atenuate sau defective (iii).

Infecția HIV este unică între virozele umane și prin faptul că stabilește totdeauna o **infecție persistentă** în care virusul rămâne latent în anumite **rezervoare**, care sunt inaccesibile răspunsului imun sau terapiei antiretrovirale. Astfel de rezervoare sunt SNC, organele limfoide centrale, tractul genital etc. S-au descris două forme de **latență**:

- **Preintegrativă** - în care HIV intră în limfocitele CD4 neactivate și unde se produce o discretă activitate reverstranscriptazică. Activarea limfocitelor dormante declanșează pusee replicative.

- **Postintegrativă** - în care genomul proviral este inserat în genomul celular și rămâne astfel până când semnale activatoare precipită infecția productivă.

Mecanismul prin care un lentivirus precum HIV determină o infecție persistentă progresivă cu sfârșit letal la om este diferit de infecția determinată de lentivirusurile simiene la gazdele naturale - maimuțele inferioare nonhominoide. La acestea din urmă infecția SIV (*simian immunodeficiency virus*) nu determină simptome, deși replicarea virală este intensă, iar limfocitele T CD4⁺ infectate sunt lizate. Principalele caracteristici ale infecției HIV la om sunt:

- Replicare virală masivă în țesutul limfoid.

- Depleția limfocitelor T CD4⁺ infectate.

- Hiperreactivitate imună generalizată.

Și la om și la maimuțe țesutul limfoid intestinal este situl principal al replicării virale și al pierderii limfocitelor T CD4⁺ infectate. Celulele țintă sunt însă diferite: limfocite la om, macrofage la maimuțe. În plus, cele mai vulnerabile celule țintă sunt cele care exprimă ambii coreceptori CD4 și CCR5. Replicarea în macrofage poate determina și la om infecții cu evoluție prelungită, iar de la subiecții nonprogresori sau supraviețuitori de lungă durată se izolează tulpini HIV macrofagotrope. Intestinul rămâne rezervorul de virus și la subiecții sub antiretrovirale, pentru că medicamentele penetrează cu dificultate acest compartiment.

MEDICAMENTE ANTIRETROVIRALE

În tratamentul infecției HIV se folosesc curent peste 20 de substanțe care provin din cinci clase:

- Analogii nucleozidici, inhibitori ai reverstranscriptazei virale (NIRT).
- Inhibitorii nonnucleozidici ai reverstranscriptazei virale (NNIRT).
- Inhibitori de proteaze (IP).
- Inhibitori ai fuziunii (IF).
- Medicamente combinate.

Clase noi de medicamente sunt în curs de evaluare: inhibitori ai adsorbției, inhibitori ai integrării etc.

Analogii nucleozidici inhibitori ai reverstranscriptazei virale (NIRT). Analogii nucleozidici sunt compuși aparținând clasei didezoxinucleozidelor, substanțe chimice formate dintr-o bază azotată și un rest glucidic a cărui grupare hidroxil din poziția 3' a fost înlocuită cu un alt substituent care nu permite participarea acestei structuri la legături fosfodiesterice. Prototipul acestei clase de substanțe este *zidovudina* (sinonime: AZT, azidotimidina, retrovirul). Acești compuși prezintă in vitro activitate inhibitorie puternică asupra replicării HIV, iar pentru unii dintre ei s-au observat efecte benefice după administrare la pacienți cu infecție HIV.

În celulele umane, analogii nucleozidici sunt fosforilați de enzimele celulare cu formarea unor intermediari activi 5'-trifosforilați. Activarea prin fosforilare este realizată de enzime diferite pentru fiecare dintre compușii acestei clase, ceea ce explică diferențele observate între acești compuși în ceea ce privește activitatea anti-retrovirală și toxicitatea.

Didezoxinucleozidele trifosforilate au efect inhibitor asupra transcrierii genomului HIV. Mecanismele care stau la baza acestei activități sunt:

- blocarea elongației lanțului ADN rezultat prin retrotranscriere, datorită imposibilității poziției 3' a didezoxinucleozidelor de a participa la legături fosfodiesterice cu alte nucleozide;
- competiția cu nucleozidele fiziologice la nivelul situsurilor de legare ale reverstranscriptazei.

Selectivitatea acțiunii didezoxinucleozidelor asupra reverstranscriptazei se datorează faptului că enzima virală, spre deosebire de ADN polimeraza alfa a celulelor gazdei, are afinitate mai mare pentru aceste molecule decât pentru nucleozidele fiziologice. Pe de altă parte, ADN polimeraza gamma (mitocondrială) a celulelor gazdei este mai sensibilă la acțiunea inhibitorie a didezoxinucleozidelor, ceea ce explică efectele toxice ale acestor substanțe.

Inhibitorii nonnucleozidici ai reverstranscriptazei virale (NNIRT). Inhibitorii nonnucleozidici ai RT sunt activi direct, fără a

necesita fosforilare intracelulară. Studiile tridimensionale cristalografice au demonstrat că inhibitorii nonnucleozidici ai RT blochează direct activitatea enzimei, fixându-se la nivelul unui "buzunar" hidrofob, situat foarte aproape de situl catalitic.

Inhibitorii nonnucleozidici ai RT au o activitate antiretrovirală adesea modestă, iar utilizarea lor trebuie făcută numai în asociere cu alți inhibitori nucleozidici de RT-ază. Întrebuințarea în monoterapie conduce rapid la apariția de mutante rezistente.

Inhibitorii de proteaze virale (IP). Sinteza antiretroviralelor cu activitate antiproteazică a fost concepută rațional, pornind de la cunoașterea structurii moleculei de aspartilprotează (p32), tipică pentru proteazele retrovirale.

Mecanismul de acțiune se bazează pe rolul cheie în replicarea virală al proteazei retrovirale p32. Proteaza clivează precursorul gag-pol în:

- proteine structurale (p24, p17, p7) și în
- enzime virale (între care RT-aza și proteaza p32 însăși).

Proteazele mamiferelor nu hidrolizează aceste legături; de aceea, acțiunea antiproteazelor este virus specifică.

Antiproteazele sunt medicamente active ca atare: nu trebuie transformate în organism, ca în cazul fosforilării analogilor nucleozidici inhibitori de RT-ază. Activitatea antiretrovirală este foarte marcată. Antiproteazele blochează maturarea și inhibă infectivitatea virionilor progeneri atât în celulele infectate activ, cât și în cele infectate cronic, penetrarea lor intracelulară fiind bună (inclusiv în macrofage și celule foliculare dendritice - CFD).

Inhibitorii fuziunii și internalizării. Reprezintă o nouă grupă de antiretrovirale care interferează timpuriu ciclul replicativ. Primul medicament avizat este Enfuvirtide sau Fuzeon® - un oligopeptid sintetic de 36 de aminoacizi care împiedică cuplarea între gp41 și coreceptorii. Alte medicamente din acest grup în curs de experimentare sunt inhibitori ai atașării, inhibitori ai coreceptorilor etc. Microbicidele care distrug virusul la poarta de intrare (în transmisia sexuală) constituie un alt grup intens studiat de antivirale.

Terapia antiretrovirală combinată divergentă

Asocierile între antiretrovirale (aRT) se pot face între medicamente din aceeași clasă (asocieri convergente) sau din clase diferite (asocieri divergente). Trebuie evitată asocierea între medicamente pentru care s-a demonstrat apariția de mutante cu rezistența încrucișată.

Asocierile divergente cunoscute sub sigla **HAART (highly active antiretroviral therapy)** sunt tratamentele de elecție în prezent. Nu trebuie omis că HAART înseamnă, în același timp, și **HEART (highly expensive antiretroviral therapy)**.

Comparațiile de aRT prezintă un triplu interes, constând în:

- diminuarea semnificativă a încărcării virale;
- întârzierea emergenței mutantelor rezistente;
- efect antiviral de durată;

Mecanismul de acțiune a HAART. Sub HAART se observă inițial o scădere rapidă a încărcării virale cu mai mult de 2 log, la 2-4 săptămâni după inițierea tratamentului. Scăderea se explică prin acțiunea pe virionii liberi și pe celulele infectate, active din punct de vedere replicativ (împreună, cele 2 compartimente reprezintă 99% din virusul plasmatic). Această scădere este urmată de o descreștere lentă, ce durează ani de zile, datorită acțiunii antiretroviralelor pe celule dendritice, pe limfocitele și macrofagele infectate latent, cu un timp de supraviețuire lung: $T_{1/2} = 1-4$ săptămâni. Acest model permite predicția unui termen de 2,3 - 3,1 ani de tratament pentru eliminarea HIV, cu excepția unor rezervoare tisulare (creier, CFD, celule NK, tract genital) nedetectabile sau greu de investigat. Persistența virusului în aceste **rezervoare** poate necesita menținerea unei terapii de susținere toată viața. De asemenea, la câteva săptămâni după inițierea HAART există creșteri semnificative în numărul limfocitelor B și al celulelor $CD4^+$ și $CD8^+$ în sângele pacienților. Tehnicile de imunofenotipare au demonstrat că celulele T cresc ca număr pe baza expansiunii compartimentului celulelor de memorie, în timp ce celulele T naive și cele NK nu suferă schimbări. Astfel, creșterea inițială în numărul limfocitelor T $CD4^+$ observată după inițierea HAART pare a fi datorată redistribuirii celulelor T și nu proliferării acestora. Celule T naive sunt produse de novo, dar foarte lent, pe o perioadă de 6 luni de la inițierea HAART. Acest fenomen se produce doar la indivizii care prezintă reduceri ale încărcării virale ca răspuns la tratament.

HAART și istoria naturală a infecțiilor oportuniste în SIDA. Efectul HAART asupra istoriei naturale a infecțiilor oportuniste din SIDA relevă capacitatea de refacere a răspunsului imun și importanța acestuia în patogenia unor infecții oportuniste. Două categorii de schimbări pot surveni în evoluția infecțiilor oportuniste în urma aplicării HAART:

- efecte benefice (vindecare sau ameliorare) și
- efecte paradoxale (agravare sau recăderi).

Evoluția sarcomului Kaposi (agent etiologic: herpesvirusul uman HH8), a leucoencefalopatiei progresive multifocale (agent etiologic: papovavirusul JC), a maladiei molluscum contagiosum (agent etiologic: poxvirusul molluscum contagiosum) și a unor infecții fungice (criptosporidiază și microsporidiază) este ameliorată. Efecte paradoxale s-au înregistrat în infecțiile cu mycobacterii (*Mycobacterium avium* complex; *Mycobacterium leprae*), în retinita cu virus citomegalic și în hepatita B. Reacția paradoxală la HAART datorată acutizării ultimelor afecțiuni citate se explică prin rolul răspunsului imun în patogenia infecțiilor. De multe ori, agravarea simptomatologiei este interpretată ca o

reacție adversă la HAART când, dimpotrivă, semnalează tocmai răspunsul la medicamente.

De reținut:

- un tratament eficient înseamnă o scădere semnificativă, adică de cel puțin 3 ori (0,5 log) a încărcării virale;
- durata efectului antiviral este cu atât mai mare cu cât încărcarea virală este mai scăzută, până la nedetectabilă sub tratament;
- intensitatea efectului antiviral este funcție de tipul tratamentului (HAART > monoterapie);
- spre deosebire de prognostic, în cazul tratamentului există o bună corelație între reducerea ARN/HIV plasmatic și răspunsul imunologic al organismului, exprimat prin restaurarea numărului și funcționalității celulelor CD4 pozitive.

EPIDEMIOLOGIE

În decembrie 2005 numărul de cazuri raportat global era de peste 40 milioane. Variații mari se înregistrează pe continente (tabelul 24.I), fiind frapantă prevalența mare în țările din Africa sub-Sahariană, regiunea cea mai afectată. Aici sunt țări în care 3 din 10 locuitori sunt purtători ai virusului. În România, numărul celor infectați, la începutul anului 2006 trecea de 12 000.

TABELUL 24.I

SITUAȚIA PANDEMIEI SIDA LA SFÂRȘITUL ANULUI 2005
(adaptat după: AIDS Epidemic Update 2005, www.who.int)

Continental	Adulți și copii infectați HIV	Prevalența la adulți la suta de locuitori	Infecții noi per zi	Decese SIDA per zi
Africa sub-Sahariană	25 000 800	7,2	8 700	6 500
Asia de Sud/SE	7 400 000	0,7	2 700	1 300
Europa de SE și țări din fosta U.R.S.S.	1 600 000	0,9	740	170
America Latină	1 800 000	0,6	550	180
Asia de Est	870 000	0,1	380	110
Africa de Nord	510 000	0,2	180	160
America de Nord	1 200 000	0,7	120	50
Caraibe	300 000	1,6	80	70
Uniunea Europeană	720 000	0,3	60	30
Australia, Noua Zeelandă	74 000	0,5	20	10
Total	40 300 000	1,1	13 530	8 580

În România, spre deosebire de alte țări europene, numărul cel mai mare de cazuri SIDA se înregistrează la copii și adolescenți sub 19 ani. Până în 1990-91 peste 90% din copii au fost infectați iatrogen, datorită unor proceduri medicale incorecte. În prezent, în jur de 15% din copii au fost infectați materno-fetal, iar 20% din cazuri sunt la adulții 15-49 de ani. Distribuția cazurilor la adulți după calea de achiziție a infecției este: heterosexuale: 50%; homosexual: 2%; transfuzii, hemofilici: 33% etc.

DIAGNOSTICUL INFECȚIEI HIV

Diagnosticul infecției HIV cuprinde următoarele etape:

- **Diagnosticul de triaj** care se face prin teste imunoenzimatic (directe sau indirecte) sau prin teste rapide de imunoaglutinare.

- **Diagnosticul de confirmare** care poate recurge la Western blot (imunoamprente), cel mai frecvent, sau la RT-PCR. Imunofluorescența sau radioimunoprecipitarea (RIPA) nu se mai folosesc pentru confirmare.

- **Diagnostic pentru monitorizarea încărcării virale.**

Dozarea încărcării virale se poate face în mononucleare periferice (PBMC) sau în plasmă. Pentru fiecare eșantion sunt recomandate metode specifice:

pentru PBMC:

- titrarea virusului în diluții sau
- PCR/ADN proviral cantitativ (amplificare genică);

pentru plasmă:

- antigenemia p24 (ELISA) sau
- titrarea virusului în diluții limită,
- RT-PCR pentru ARN/HIV (amplificare genică după reverstranscriere),
- bDNA pentru ARN/HIV (hibridizare),
- NASBA pentru ARN/HIV (amplificare în două etape).

Recomandările actuale stabilesc inițierea timpurie a terapiei aRT, de regulă atunci când încărcarea virală crește peste 50 000 copii ARN HIV/ml, iar limfocitele CD4 scad sub 350/ml. Argumentele pentru tratamentul timpuriu sunt: se prezervă izolatele M-trope, scade riscul transmiterii infecției, răspunsul este mai bun și mai îndelungat, iar calculul cost/eficiență mai avantajos.

Criteriile de monitorizare a terapiei vizează:

- Scăderea încărcării virale plasmatice sub 400 de copii/ml (preferabil <50 de copii/ml). Încărcarea virală se determină cel puțin de două ori pe an.

- Extinderea calității și duratei supraviețuirii.

TRANSMISIA MUTANTELOR VIRALE REZISTENTE LA ANTIRETROVIRALE

În prezent, detecția infecțiilor primare cu mutante rezistente la AZT atinge între 5-15% din numărul cazurilor noi confirmate în țări cu largă disponibilitate pentru oferta de medicamente (S.U.A., Australia, Elveția). Din anii 1998-99 au fost diagnosticate infecții primare rezistente la multiple droguri, inclusiv la antiproteaze. Apariția mutantelor rezistente și la antiproteaze este strâns legată de utilizarea lor extensivă. Mutantele multiplu rezistente par a avea o virulență mai scăzută pentru că, în ciuda unei încărcări virale de peste 103, numărul limfocitelor CD4 se menține la valori peste 400 cel/ml.

Ultima decadă a adus ca element nou evoluția frecventă a unor cancere viral induse în faza finală a infecției HIV. Aceste cancere sunt datorate coinfectiei HIV cu dezoxiribovirusuri oncogene:

- cancerul de col datorat infecției persistente cu HPV la femeile HIV seropozitive,

- sarcomul Kaposi (determinat de infecția cu herpesvirusul uman 8) și

- leucemii - limfoame (asociate cu infecția cu virusul Epstein-Barr). Incidența infecției cu HPV la femeile seropozitive HIV crește pe măsura agravării imunosupresiei, în mod deosebit la cele cu numărul limfocitelor CD4⁺ sub 500.

PERSPECTIVA UNUI VACCIN ÎN SIDA

Zece ani de studii și sute de milioane de dolari cheltuiți nu au condus la obținerea unui vaccin eficient. Totuși, câteva descoperiri semnificative susțin posibilitatea unui vaccin în infecția HIV:

- existența unor subiecți care rămân neinfecțați în ciuda expunerii repetate la virus;

- demonstrarea unui răspuns imun robust la nonprogresori;
- capacitatea răspunsului imun de a controla încărcarea virală mult timp în faza de latență;

- rezultate promițătoare cu vaccinuri în infecția SIV la maimuțe.

Un vaccin acceptabil pentru infecția HIV trebuie să îndeplinească trei criterii: să prevină infecția persistentă, să inhibe semnificativ încărcarea virală și să încetinească progresia infecției către stadiul de SIDA, să reducă transmisia infecției.

Vaccinurile candidate cele mai promițătoare sunt listate la www.iavireport.org/trialdb. Preparatele testate în prezent conțin ca imunogeni; glicoproteina gp120, peptide sintetice care mimează epitopi ai gp120 și diverși vectori virali care conțin informația genetică pentru sinteza unor gene HIV (în special, gag-pol-nef).

Sinteză

Morfologia virionului HIV: virion icosaedric cu capsidă și anvelopă cu proiecții glicoproteice 7 nm lungime. Diametrul 110-130 nm.

Genomul este ARN ss linear, sens pozitiv, cu 8,2-10,6 kb cu 2 copii per virion. Cele două copii sunt incluse în capsida de aspect conic. Populația virală conține o varietate de quasispecii.

Replicare: endocitoză mediată de recunoașterea receptorului CD4 (de pe limfocitele T, macrofage etc.) de către glicoproteina virală gp120 și fuziune promovată de glicoproteina virală gp41. Sediul replicării: nucleul. Reasortări frecvente în cazul infecțiilor simultane cu tulpini diferite - sursă de variabilitate. Multipli intermediari în cursul reverstranscrierii (altă sursă de variabilitate), între care genom negativ cu codoni stop prematuri, genom pozitiv cu codoni stop prematuri, ADNds etc.

Boală asociată: SIDA.

BIBLIOGRAFIE

Apetrei C, Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I, Damond F, Duca M, Simon F, Brun-Vezinet F. Human immunodeficiency virus type 1 subtype F reverse transcriptase sequence and drug susceptibility. *J. Virol.* 1998;72:35342.

Cernescu CE, Tardei G, Necula A, Ruta SM, Pau CP. The serologic significance of F viral genotype for human immunodeficiency virus type 1 epidemic. *J. Infect. Dis.* 1994;170:1043-4.

Colebunders R, Moses KR, Laurence J et al. A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6:53-59.

HIV Medicine. 14th edition free on web. la www.amadeo.org.

Pătrașcu IV, Constantinescu SN, Dublanchet A. HIV-1 infection in Romanian children. *Lancet* 1990;335:672.

WHO/UNAIDS. Progress of global access to HIV antiretroviral therapy. An update on "3 by 5". June 2005: de accesat la www.who.int/hiv/pub.

WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: guidelines for a public health approach; 2003 revision http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/arvrevision2003.

Adrese de Internet utile celor interesați de diagnosticul, tratamentul și prevenirea infecției HIV

<http://hivatis.org/atisnew.html> (HIV AIDS Treatment Information Service)

<http://www.actis.org> (AIDS Clinical Trials Information Service) și de aici prin - <http://www.actis.org/relatedwebs.html> o suită de alte situri grupate pe capitole de interes (prevenție, transmitere, vaccinuri, infecția HIV pediatrică, reagenți pentru diagnostic etc.).

<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite> - extrem de complexă bază de date a Universității din California, San Francisco, cu statistici de ultimă oră și informații despre prevenție, transmitere, terapie, cercetări multidisciplinare.

<http://www.medscape.com/Home/Topics/ID/AIDS.html> - o adresă indispensabilă tuturor specialiștilor implicați în tratarea pacienților HIV pozitivi.

<http://www.cdc.gov/std/program> - pentru prevenția bolilor transmisibile sexual (STD), a TBC și SIDA

CAPITOLUL 25

HEPATITE VIRALE

De reținut:

Hepatitele virale sunt determinate de virusuri aparținând la diverse familii. Ele sunt tratate împreună pentru a sublinia diferențele clinice în cazul unor afecțiuni acute, inițial asemănătoare ca simptomatologie. Didactic, virusurile cu tropism exclusiv pentru hepatocit sunt numite hepatitice și cuprind:

- virusurile hepatitelor cu transmitere fecal-orală: A și E, pe de o parte, și

- virusurile cu transmitere predominant parenterală: virusurile hepatitelor B, C, D, G și TT (transmis prin transfuzie).

O altă grupă de virusuri sunt *facultativ* hepatotrope: enterovirusuri, herpesvirusuri (CMV, EBV) sau arbovirusuri. Acestea sunt tratate la familiile respective. În acest capitol, o atenție aparte va fi acordată virusului hepatitei A (enterovirus), C (flavivirus), D (viroid) și E (calicivirus). Virusul hepatitei B este tratat la familia hepadnaviridae (tabelul 25.I).

Istoric. În 1942, McCallum diferențiază hepatitele virale acute în hepatite A (cu transmitere digestivă) și B (cu transmitere parenterală, "prin ser omolog"). Între 1945-1950, Ștefan S. Nicolau și N. Cajal, printr-un studiu extensiv histopatologic și clinic, ajung la concluzia că hepatitele virale nu sunt produse doar de două virusuri, ci de mai multe tipuri, impunând pe plan internațional conceptul pluri-etilogiei hepatitelor virale, larg argumentat în prezent. Un progres major l-a constituit studiul lui Krugman pe voluntari umani, care a izolat două tulpini MS 1 (hepatita A) și MS 2 (hepatita B), complet diferite antigenic și ca proprietăți. În 1963, Baruch Blumberg descoperă antigenul Australia (mai târziu, AgHBs) și implicațiile portajului cronic al infecției cronice cu virusul hepatitei B, primind împreună cu Gajdusek premiul Nobel pentru conceptul persistenței virale ca element etiologic în multe afecțiuni.

În 1977, Rizzetto descoperă antigenul Delta în nucleii pacienților cu forme severe de hepatită B și tot el demonstrează transmiterea

virusului la cimpanzeu numai în prezența VHB. În 1999, Choo și colaboratorii descoperă prin clonare moleculară virusul hepatitei C.

Pentru profilaxia hepatitelor virale există vaccinuri inactivate foarte eficiente pentru hepatitele A și B. Aplicarea lor nu a asigurat însă o acoperire vaccinală suficientă pentru a se obține scăderi semnificative ale incidenței celor două afecțiuni. Hepatitele virale A și B rămân printre cele mai costisitoare boli care ar putea fi prevenite prin vaccinare.

TABELUL 25.1

COMPARAȚIE ÎNTRE VIRUSURILE HEPATITICE

Virusul	VHA	VHB	VHC	VHD	VHE
Familia	picorna	hepadna	flavi	viroid	calici
Acid nucleic	ARN ss	ADN ds	ARN ss	ARN circular	ARN ss
Diametru nm	27	42	55-65	36	40
Transmitere	fecal-orală	multiple căi	parenterală, mai ales	parenterală	fecal-orală
Stabil în mediu	stabil	foarte stabil	labil	labil	labil
Incubație (săptămâni)	4-6	12-16	8-10	12-16	6
Forme inaparente %	90	60	50	?	50
Replicare extra-hepatică	intestin	leucocite	nu	nu	intestin
Cronicizare	absentă	în funcție de vârstă (10-90%)	>85%		absentă
Carcinogeneză	nu	da	da	nu	nu
Vaccinuri	inactivat sau atenuat	recombinant	nu există	profilaxia VHB	inactivat

Transmiterea hepatitelor B și C se face pe căi multiple: parenterală, materno-fetală, sexuală. În general, bărbații sunt mai susceptibili și fac forme mai grave și complicații mai frecvente. Incidența formelor cronice de infecție cu VHB și VHC (hepatita cronică, ciroza, carcinomul hepatic) este de 2,5-3,5 ori mai ridicată la bărbați. Se pare că prezența unui extracromozom X protejează femeile față de toate agresiunile externe, nu numai în raport cu infecțiile virale. Totuși, inexplicabil, transmiterea materno-fetală a hepatitei C este de două ori mai eficientă la feții de sex feminin.

VIRUSUL HEPATITEI A (VHA)

De reținut:

Hepatita A ("infecțioasă" sau "alimentară") este determinată de un picornavirus. Este o boală blândă la copiii mici, cu un procentaj ridicat (>90%) de forme inaparente, care nu se cronicizează. Formele severe afectează mai ales adulții. Profilaxia cu imunoglobuline standard administrate intramuscular este foarte eficientă. Exisă două forme de vaccin: inactivat și viu atenuat (ultimul produs în China).

Încă de la sfârșitul ultimului război mondial a devenit evidentă etiologia distinctă a două forme de hepatită virală acută: hepatita A cu transmitere fecal-orală și hepatita B cu transmitere parenterală. Virusul hepatitei A (VHA) este un picornavirus și determină peste 90% din hepatitele virale acute. Picornavirusurile sunt virusuri cu genom ARNss, cu polaritate pozitivă, de talie mică (~30 nm) și neanvelopate. Lipsa anvelopei explică rezistența picornavirusurilor la dezinfectante, la pH-ul acid al sucului gastric, la sărurile biliare etc (tabelul 25.II).

TABELUL 25.II

VIRIONUL VHA

Morfologie: icosaedrică, fără anvelopă

Diametru: 27 nm

Componente: capsida cu 60 capsomere (un capsomer = 3 polipeptide: VP1, VP2, VP3), genomul ARNss(+) cu 3 regiuni (P1, P2, P3), la capătul 5' - tract polipirimidinic (pY1) și ISRE (*interferon stimulated response element*)

VHA este prototipul unui gen separat din familia picornaviridae: heparnavirus. VHA este rezistent la căldură, pH acid, alcool-eter. Numai fierberea la peste 85°C, cel puțin 3 minute, inactivează virusul. Apa neclorinată, băuturile nesterilizate, fructele și alte preparate culinare neprelucrate termic transmit virusul. Risc mare de infecție au turiștii care folosesc surse de apă nesupravegheate, care consumă fructe și legume proaspete, nespălate. Cuburile de gheață, înghețata, fructele de mare sunt frecvent suspectate drept sursă a epidemiilor.

Replicarea VHA este redată în tabelul 25.III.

TABELUL 25.III

REPLICAREA VHA

Receptor: proteina transmembranară poliglicozilată asemănătoare mucinei

Internalizare prin endocitoză

Situl replicării: citoplasma

Enzima: polimeraza ARN dependentă ARN (VP2 à 2B, 2C). Polimeraza suferă mutații după adaptarea VHA la culturi de celule

Asamblare lentă în citoplasmă

Eliberare prin citoliză

Titru în culturi: 10^8 DIC₅₀/ml

Virionul VHA are o structură asemănătoare poliovirusurilor. Genomul ARNss cu polaritate pozitivă este protejat de o capsidă cu 60 de capsomere. Fiecare capsomer este format prin alăturarea a trei polipeptide: VP1, VP2 și VP3 (fig. 25.1). Genomul codifică inițial un precursor poliproteic de 2 200 de aminoacizi, care va fi clivat pentru a genera 4 polipeptide structurale și 4 nonstructurale (cu rol enzimatic, în replicare). În plus, ambele capete ale genomului viral conțin structuri conformaționale complicate care interacționează specific cu proteinele gazdei, contribuind la tropismul celular. Adaptarea VHA la culturi de celule a fost un element important pentru obținerea vaccinului anti-hepatită A. În procesul de adaptare au apărut modificări însemnate în secvența genomului, dar antigenicitatea virusului a rămas similară cu a tulpinilor circulante (sălbatică). O substituție de aminoacizi Val → Ala la nivelul peptidului 2B constituie modificarea timpurie care condiționează adaptarea la culturi de celule.

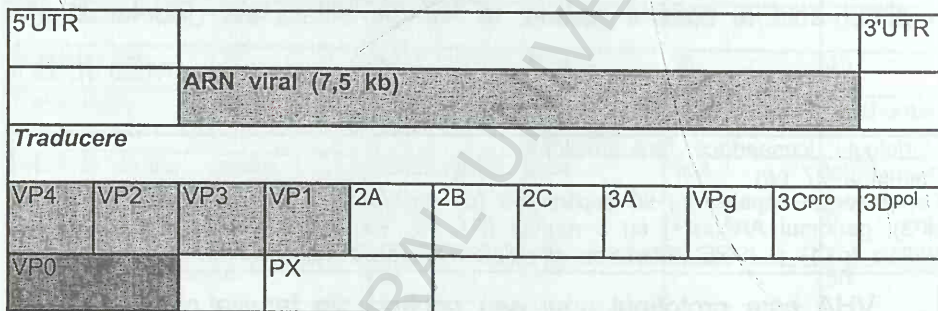


Fig. 25.1. Structura și funcția genomului VHA. Proteinele capsidare (VP0 la VP4) sunt hașurate. VP0 este poliproteina precursoră completă. Celelalte proteine nehașurate sunt utilizate în replicare. De exemplu: 2C este helicaza, 3 este ancora la membrana celulară, VPg este primer pentru replicarea ARN viral.

Mai multe elemente singularizează VHA între picornavirusuri și au determinat încadrarea lui separat de enterovirusuri într-un gen relativ recent conturat - hepatovirus (tabelul 25.IV).

Din punct de vedere antigenic, VHA este foarte stabil, existând un singur serotip cu un singur epitop dominant. Anticorpii monoclonali edificați cu izolate VHA din regiuni geografic distincte neutralizează în egală măsură infectivitatea. Totuși, diferențe datorate unor substituții de aminoacizi în VP1 și în VP3 au permis separarea a 3 genotipuri umane și trei simiene.

Hepatita A este o boală cu transmitere *enterică* care determină la debut stare generală alterată, anorexie, greață, febră. Aceste simptome sunt urmate de apariția sindromului icteric. Forme ușoare sau anicterice se întâlnesc frecvent la copii, în contrast cu adulții, care

TABELUL 25.IV

PROPRIETĂȚILE VHA COMPARATIV CU ALTE PICORNAVIRUSURI

Date	Hepatovirus	Enterovirus	Rhinovirus	Aphtovirus	Cardiovirus
Ø virion	27-30	22-28	24-30	23-25	24-30
Genom kb	7,5	7,4	7,2	8,4	7,8
Stabil pH<7	pH 1	pH 3	labil	labil	pH 3
Stabil >60°C	da	nu	nu	nu	nu
5'-poliY tract	poli UUCC	nu	nu	poli (C)	poli (C)
IRES*	tip II	tip I	tip I	tip II	tip II
Ciclu replicativ	f. lent	rapid	rapid	f. rapid	f. rapid
Gazdă	om, primate	primate	mamifere	rumegătoare unicopitate	mamifere
Organ țintă	ficat, intestin	SNC, mușchi?, intestin	mucoasa respiratorie	sistemic	SNC, miocard, ficat
Transmisie	fecal-oral	fecal-oral, respirator	respirator	respirator	respirator?
Relații gene-tice cu:	Nu	entero cu rhinovirus	rhinovirus cu enterovirus	aphtovirus cu cardiovirus	cardiovirus cu aphtovirus

*IRES - *internal ribosomal entry site*.

fac forme severe (în 1‰ din cazuri chiar forme fulminante, letale). Incubația este de 3-4 săptămâni, spre deosebire de hepatita B, unde este de 3-4 luni.

Virusul se replică în ficat și se excretă prin bilă și scaun. Există o fază viremică care declină odată cu apariția icterului. Diagnosticul infecției acute se face prin evidențierea anticorpilor anti-VHA IgM (prin ELISA de captură). Anticorpilor anti-VHA IgG persistă toată viața după boala naturală sau după vaccinare (ei se evidențiază prin ELISA indirectă sau de competiție). În România, peste 80% din copiii sub 10 ani au trecut prin infecție, de cele mai multe ori forme asimptomatice.

Limita inferioară a titrului protector al anticorpilor nu este cunoscută. Studii de seroneutralizare in vitro, în culturi de celule, sugerează că titrul de 20 mUI/ml este suficient. Experimental, la cimpanzeii cărora li s-au administrat pasiv imunoglobuline (Ig) concentrația serică de 10 mUI/ml previne boala clinică, dar nu infecția, tradusă prin eliminarea de virus și seroconversia tardivă IgG anti-HAV.

Noile metode de diagnostic molecular prin RT-PCR ajută epidemiologii în stabilirea sursei epidemiilor și a relațiilor dintre ele. De exemplu, în Statele Unite, în 2003, s-au produs patru epidemii majore de hepatită A în 4 state diferite: Tennessee, North Carolina, Pennsylvania și Georgia. Deși s-a suspectat existența unor surse diferite, relațiile moleculare dintre izolatele virale au precizat sursa

unică: ceapa verde crudă consumată în restaurante, importată din Mexic. În această epidemie au fost raportați 601 bolnavi (rata de atac 18%), 124 spitalizări (26%) și 3 decese.

Analiza filogenetică a secvențelor nucleotidice evidențiază diferențe între genotipurile VHA în toate secvențele investigate. Cea mai mare diversitate se înregistrează pentru gena polimerazei virale. Mai ales genotipul IIIA, apropiat de tulpinile simiene, expune diferențe mari chiar între izolatele din aceeași epidemie. Opus, secvențele de aminoacizi din polipeptidele capsidare sunt similare și nu permit decât o vagă distincție între genotipuri.

Metode ultrasensibile sunt folosite pentru detecția VHA contaminant din produsele alimentare sau chiar în lichidele cu care acestea au fost procesate. De exemplu, combinând captarea imunomagnetică într-un prim timp cu RT-PCR s-a putut detecta numai 0,5 DIC₅₀/ml, VHA reușind concentrarea suspensiei virale de peste 20 de ori. Limita de detecție pentru alte picornavirusuri este mult mai scăzută - 0,001 DIC₅₀/ml în panelul de proficiență furnizat de *EU Concerted Action for Enteroviruses*.

PROFILAXIE

Profilaxia se realizează prin trei intervenții:

- ameliorarea igienei personale și comunitare, asigurarea apei potabile necontaminate;
- imunoglobulinoprofilaxia pre- și postexpunere;
- imunizarea activă prin vaccinare

Proporția mare de adulți care au trecut prin boală asigură prezența unei concentrații ridicate de anticorpi anti-VHA în imunoglobulinele (Ig) standard. Administrarea înainte de contact sau în intervalul de două săptămâni postcontact determină protecție în peste 85% cazuri. De regulă, administrarea postinfecție previne numai boala clinic manifestă, nu și infecția. Ig profilaxia este indicată în focar tuturor susceptibililor. Această intervenție previne epidemia în colectivitate sau în familie. Majoritatea contactilor sub Ig profilaxie fac totuși infecția rămânând imuni pentru restul vieții. Ig profilaxia este o opțiune și pentru turiștii din țările fără endemie, în zonele hiperendemice. Administrarea de imunoglobuline într-o doză unică de 0,02 ml/kg corp trebuie nuanțată în funcție de datele epidemiologice concrete și de durata călătoriei în arealele endemice (tabelul 25.V).

TABELUL 25.V

DOZAJUL IG STANDARD PENTRU PROFILAXIA HEPATITEI A

Vârsta	Doza joasă	Doza înaltă
	Pentru călătorii sub 2 luni	Pentru călătorii 3-5 luni și la contact
<10 ani	125 mg	250 mg
>10 ani	250 mg	500 mg
Toate vârstele	0,02-0,04 ml/kg corp	0,06-0,12 ml/kg corp

Vaccinarea se face cu vaccin inactivat însă nu este inclusă între imunizările obligatorii în România. Mai recent, în China a fost introdus un vaccin viu atenuat care se administrează oral.

Sinteză

Virusul hepatitei A - familia picornaviridae, gen heparnavirus; virus cu genom ARNss nesegmentat (talie genomului ~8kb), simetrie cubică, neanvelopat; virus rezistent la căldură și dezinfectante.

Hepatita A:

- transmitere fecal-orală, dar și sexuală, și parenterală,
- incubatie medie: 25 zile,
- forme anicterice în 90% din cazuri la copil, forme fulminante: 0,1%,
- vindecare fără cronicizare,
- diagnostic infecție acută recentă: anticorpi anti-VHA de tip IgM (ELISA),
- profilaxie specifică: vaccin inactivat,
- profilaxie nespecifică: igienă personală sau gammaglobuline la contact.

BIBLIOGRAFIE

- Feinstone S et al. Descoperirea virusului hepatitei A prin imunoelectronmicroscopie. Science 1973;182:1026-1028.
- Ticehurst JR et al. Producerea sintetică a virusului din ADNc. PNAS 1983;80:5885-5889.
- Werzberger A et al. Vaccin inactivat cu tulpina CR326. NEJM 1992;327:453-457.
- Mao JS et al. Vaccin viu atenuat introdus în China. Vaccine 1997;15:944-947.

VIRUSUL HEPATITEI C (VHC)**De reținut:**

Virusul hepatitei C a fost descoperit în 1989 prin biologie moleculară. Se apreciază că 175 milioane de subiecți sunt infectați glo-

bal cu VHC, iar un sfert din bolnavii HIV sunt și coinfectați VHC (condiție agravantă pentru evoluția infecției HIV). VHC face parte din familia flaviviridae (genom ARNss, 9 500 nucleotide, polaritate pozitivă). Posedă o anvelopă cu proiecții din proteine hidrofobe, care se îmbracă în betalipoproteine plasmaticice ce ecranează antigenitatea virusului. Seroconversia după infecție este tardivă (după circa 100 de zile), ceea ce face ca mulți donatori de sânge infectați să scape triajului și să amplifice endemia. În populația generală, numărul celor infectați în România este în jur de 4,5%. Infecția se transmite preponderent pe cale parenterală. Transmiterea materno-fetală sau sexuală este minimă.

INTRODUCERE

VHC infectează aproximativ 200 milioane de oameni în lume, adică 3% din populație, producând o pandemie virală cu o răspândire de cinci ori mai mare decât infecția HIV. Prevalența mare a hepatitei C se datorează transmiterii parenterale, în special prin transfuzii de sânge sau derivate de sânge. Măsurile de screening serologic al sângelui pentru depistarea diferitelor infecții au scăzut riscul bolilor transmise posttransfuzional, dar noi cazuri de hepatită C apar prin folosirea de droguri injectabile și prin expunere percutană sau mucomembranoasă. Progresia spre hepatită cronică C apare la majoritatea pacienților infectați VHC (>80%), astfel încât hepatita C cronică a devenit cauza majoră de transplant hepatic, iar complicațiile bolii se pot accentua datorită coinfecției VHC cu alte virusuri transmise parenteral. Date generale asupra epidemiei determinată de infecția cu virus hepatitic C pot fi urmărite în tabelul 25.VI. Un obstacol major în studiul VHC a fost imposibilitatea cultivării virusului in vitro. Totuși, în 2004 a fost sintetizat un replicon subgenomic capabil de a se autoreplica într-o linie de hepatom uman (Huh-7). Ulterior a fost izolată o tulpină de la un pacient cu hepatită C fulminantă care se putea replica în culturi de celule. Marcarea genomului acestui izolat cu GFP (*green fluorescent protein*) a creat un sistem în care cuantificarea inhibării virusului de anumite substanțe antivirale a devenit posibilă. Virusul hepatitei C prezintă șase genotipuri și peste 90 de subtipuri. Țintele naturale ale VHC sunt hepatocitele și, posibil, limfocitele B. Replicarea virală este susținută, chiar și în fazele cronice ale infecției, estimându-se că se produc mai mult de 10 trilioane de particule virale pe zi.

TABELUL 25.VI

CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSULUI HEPATITEI C

Flavivirus - genom ARNss(+) cu regiuni hipervariabile (quasispecii)
 Rata replicării: 10 trilioane virioni zilnic
 Titruuri plasmatice >10 milioane copii ARN VHC/ml plasmă
 Prevalența în populația generală: 2,5 - 5,1% (crește cu vârsta)
 Număr estimativ infecții în România: 600 000 - 800 000
 Mortalitate specifică estimată: 8 000 - 10 000 anual
 Noi infecții anual: 2 800 - 5 200

Replicarea se realizează sub acțiunea unei ARN polimeraze ARN dependente, a cărei fidelitate scăzută de transcriere determină dezvoltarea rapidă a quasispeciilor, ce reprezintă o continuă provocare pentru răspunsul imun al gazdei.

Quasispeciile se definesc ca populații complexe de virioni, strâns înrudiți dar distincți antigenic și genomic, ce coexistă într-o anumită gazdă infectată. Diferite izolate VHC prezintă variabilitate nucleotidică importantă, răspândită de-a lungul întregului genom viral. Proteinele anvelopei sunt codificate de o regiune hipervariabilă a genomului, ceea ce înseamnă că sunt sediul unor mutații frecvente.

Proteinele VHC și funcțiile lor sunt indicate în tabelul 25.VII.

TABELUL 25.VII

PROTEINELE VHC

Proteina	Abreviere	GM *kDa	Comentariu
**Capsidară	C	22	
Glicoproteina anvelopă	E1	31	***E1, E2 - heterodimeri, retenție în
Glicoproteina anvelopă	E2	70	
p7	p7	7	Domeniu hidrofob din E2 (E2-p7)
Nonstructurală	NS2	21	Autoprotează dependentă de Zn
Nonstructurală	NS3	70	Serin protează, helicază
Nonstructurală	NS4A	6	Cofactor NS3
Nonstructurală	NS4B	27	Component al replicazei
Nonstructurală	NS5A	56	Serin fosfoproteina, inhibă PKR****
Nonstructurală	NS5B	68	Polimeraza ARN dependentă ARN

*GM - greutate moleculară;

**proteina capsidară are rol în steatoză și (?) transformare;

***conțin epitopii seroneutralizanți;

****inhibitor de interferon (IFN) - asociat rezistenței la tratamentul cu IFN.

Aceste mutații determină existența a cel puțin 6 genotipuri distincte între care diferența de omologie în secvență este >30%. De asemenea, au fost semnalate diferențe intragenotipice, ceea ce înseamnă că VHC poate evita răspunsul imun al gazdei selectând dintre *quasispeciile* care alcătuiesc populația virală variante nonneutralizabile.

Deci, quasispeciile sunt variante intragenotipice care diferă în secvență numai prin câteva procente. Diversitatea quasispeciilor care rezultă din mutațiile în regiunea hipervariabilă a genomului interferează cu capacitatea protectoare a răspunsului imun. Atât imunitatea umorală, cât și cea celulară nu țin pasul cu variabilitatea virusului. Noile quasispecii pot reinfecța gazda care a edificat un răspuns imun inițial. Reinfecțiile explică rata înaltă a cronicizărilor în hepatita C.

Infecția acută este urmată cel mai frecvent de infecția cronică (>80% din cazuri), iar eliminarea spontană a virusului este rară. Afectarea hepatică este progresivă pe perioade de timp extrem de variabile. O treime dintre pacienții infectați prezintă o complicație hepatică severă (ciroză, cancer) în mai puțin de 20 de ani, în schimb, la o altă treime, boala nu se agravează timp de 30 de ani sau mai mult.

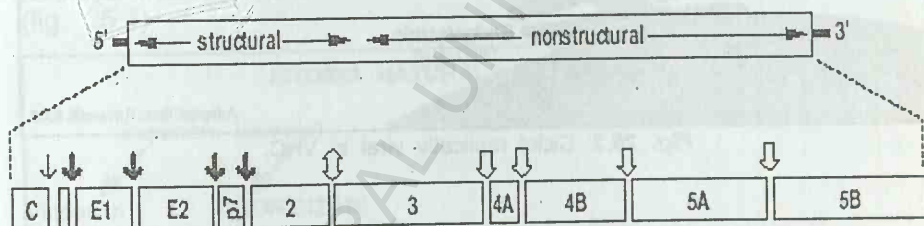
Această infecție constituie o problemă importantă de sănătate publică nu numai prin frecvență, dar și prin procentul extrem de mare de cronicizări. Datele privind epidemiologia virusului hepatitei C se modifică foarte rapid, datorită faptului că se aplică teste de diagnostic cu sensibilitate și specificitate din ce în ce mai crescute.

STRUCTURA VIRUSULUI HEPATITIC C

VHC este un virus ARN de aproximativ 9,5 kb, aparținând familiei flaviviridae, genul hepacivirus. Manipularea genetică a ARN provenit din virionul VHC a produs o replicare susținută în linii derivate din hepatocite. Infecția experimentală a fost realizată prin injectarea de ARN-VHC recombinant la cimpanzei, aceasta fiind urmată de apariția semnelor clinice și histopatologice de hepatită C. VHC codifică o singură poliproteină de 3 011 aminoacizi, care este apoi procesată în 10 proteine mature, cu funcții structurale sau reglatoare. ARN VHC conține un singur cadru deschis de citire (*open reading frame: orf*) și două regiuni netraduse (NTR) la capete.

Regiunea 5' NTR are 341 de nucleotide și conține situsul intern de intrare în ribozom (*internal ribosome entry site: IRES*) ce permite legarea ribozomilor rapid și avid în imediata vecinătate a codonului start al orf, fără a fi necesari factori de pre-inițiere. Regiunea 3' NTR are o structură tripartită, compusă dintr-o regiune variabilă ce urmează după codonul stop al orf, un tract poliuridinic de lungime variabilă și o secvență de 98 de nucleotide denumită "coada X", înalt conservată între genotipurile VHC și jucând un rol esențial în replicarea *in vivo*.

Poliproteina de 3 011 aminoacizi este clivată în proteine unice (fig. 25.2, săgeți pline), pe de o parte, de către o peptidază-semnal a gazdei, rezultând proteina capsidară (C) și cele două proteine ale anvelopei (E1, E2), iar, pe de altă parte (fig. 25.2, săgeți goale), de către proteaze codificate de virus, rezultând proteinele nonstructurale: NS1 - NS5.



adapted from Bartschlagler 2000 and N. Kato 2001

Fig. 25.2. Proteinele VHC și situsurile de clivare (modificat, după Bartschlagerr, 2000 și Kato, 2001).

Pe E2 există 2 regiuni denumite regiunile hipervariabile (HVR1 și HVR2) care prezintă numeroase modificări ale secvenței de aminoacizi ca rezultat (probabil) al presorului imun reprezentat de anticorpilor anti-VHC. Tot la nivelul proteinei E2 se găsește și situsul de legare al CD81, o tetraspanină exprimată pe membrana hepatocitelor și limfocitelor B și presupusă a fi receptor sau coreceptor pentru VHC. Ciclul replicativ al VHC este inițiat de legarea VHC de receptorul celular (CD81) și de un complex lipoproteic și este urmat de internalizarea virusului în hepatocit (fig. 25.3).

Proteinele nonstructurale au funcții de proteaze (NS2, NS3, NS4A), helicază (NS3), ARN polimerază (NS5B). O regiune a NS5A a fost corelată cu răspunsul la terapia cu interferon, de aceea se numește *interferon-sensitivity-determining-region* (ISDR).

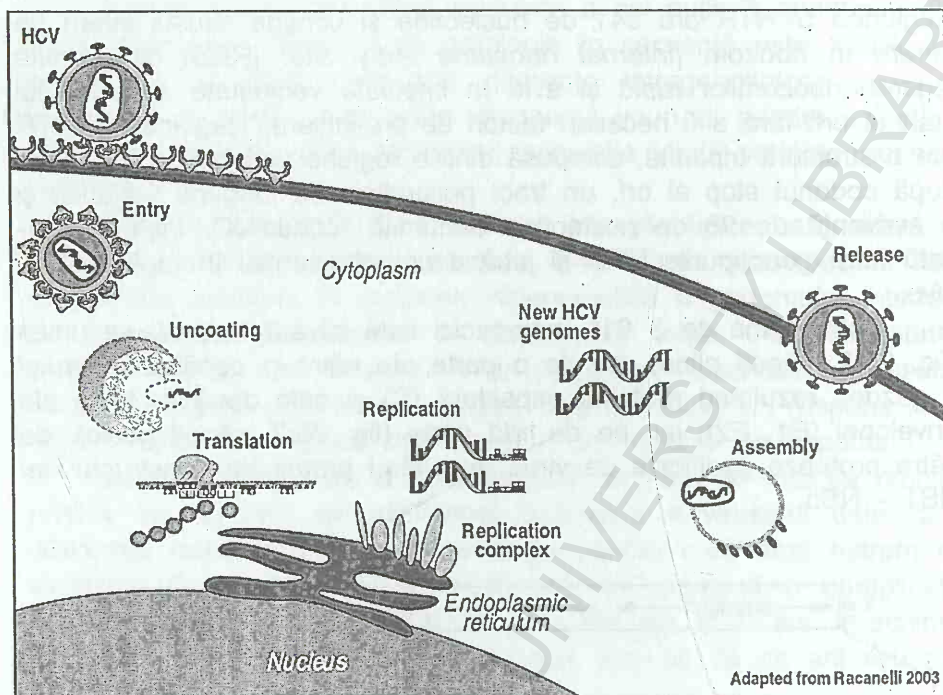


Fig. 25.3. Ciclul replicativ viral al VHC.

MECANISMELE PERSISTENȚEI VIRALE

Consecințele existenței quasispeciilor implică dezvoltarea de mutante rezistente la imunitatea celulară și umorală, mutante cu tropism celular diferit (de exemplu, limfotropism versus hepatotropism). Variabilitatea pronunțată a VHC explică și întârzierea obținerii unui vaccin sau apariția rapidă a rezistenței la terapie. S-a demonstrat recent că apariția variantelor VHC cu liganzi peptidici alterați, cum ar fi antagoniștii de TCR (receptorul pentru antigen al limfocitelor T) asigură un mecanism de cronicizare a infecției VHC. Frecvența substituițiilor nucleotidice spontane este estimată la aproximativ 10^{-2} până la 10^{-3} substituții per nucleotid per an. Anticorpii neutralizanți sunt specifici împotriva tulpinii sau quasispeciei pentru care au fost sintetizați, astfel încât sunt incapabili să prevină apariția noilor variante (care se vor replica și vor deveni noua tulpină dominantă) și, de asemenea, nu pot proteja individul împotriva unei reinfecții.

În afara diversității virale, există și alte mecanisme care par a fi implicate în persistență. VHC are capacitatea de a inhiba răspunsul citokinelor de tip T_{H1} , cum ar fi interferonul gamma sau IL-2 și,

concomitent, amplifică răspunsul citokinelor tip T_{H2} , cum sunt IL-10 și IL-4, cu rol permisiv pentru replicarea virală.

Prezența limfocitelor în parenchimul hepatic a fost interpretată ca o evidență a distrucției imun-mediate. Clearance-ul viral este asociat cu un răspuns puternic și specific al limfocitelor T (LT) citotoxice și helper. Răspunsul T helper pare a fi cel mai important, deoarece lipsa lui este legată de reapariția virusului în sânge. Răspunsul relativ slab al LT citotoxice la persoanele cu infecție cronică pare a fi insuficient pentru controlul viremiei, dar este suficient pentru a crea leziuni hepatice colaterale, sinergic cu sinteza crescută de citokine proinflamatorii în ficat. O imunitate inefficientă a persoanelor ce ajung la infecție cronică VHC este demonstrată de apariția la om de suprainfecții VHC cu genotipuri diferite.

Persistența virală este o cerință fundamentală pentru apariția hepatitei cronice, dar mecanismele persistenței virale și cele ale injuriilor hepatocitare pot fi diferite. Este clar că efectul citopatic viral nu este singurul ce determină leziuni hepatice, pentru că încărcări virale mari în ser și hepatocite sunt compatibile cu leziuni celulare minore. Evoluția infecției naturale VHC este rezumată în schema următoare (fig. 25.4).

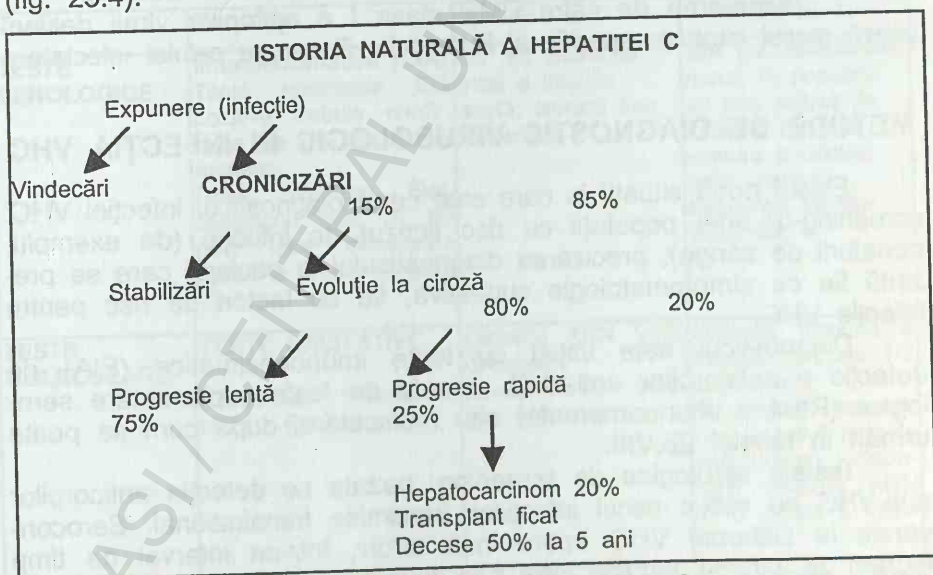


Fig. 25.4. Istoria naturală a hepatitei C.

RĂSPUNSUL IMUN CELULAR ȘI UMORAL ÎN HEPATITA VIRALĂ C

Sinteza anticorpilor anti E1, E2, C (core) se examinează cu ajutorul testelor imunoenzimatic ELISA iar pentru detecția răspunsului

imun celular se efectuează testul ELISPOT, cu determinarea IFN gamma pe splenocite izolate la 4 săptămâni după inocularea inițială. Implicarea proteinei core VHC în sensibilizarea LT și în evoluția leziunilor hepatice este susținută de prezența ei în citoplasma limfocitelor infiltrate în spațiul port. Aceste rezultate sugerează că proteina C induce injurii hepatice prin creșterea apoptozei Fas mediate și prin infiltrarea ficatului cu limfocite periferice.

De asemenea, nu este sigur dacă LT citotoxice sunt implicate în injuriile hepatice, deoarece bolile hepatice cele mai grave sunt asociate pacienților imunodeprimați (coinfectați HIV). Se consideră că leziunile hepatice rezultă dintr-un joc complex între citopatogenitatea virală, citotoxicitatea mediata celular, efectele citokinelor și evenimente apoptotice petrecute la nivel hepatic.

De partea gazdei există însă și mecanisme de apărare a hepatocitelor împotriva infecției VHC, cum ar fi:

- ocuparea receptorilor pentru interferon și/sau pentru alte citokine este urmată de un "status antiviral" al celulei;
- legarea celulelor NK la celula infectată este urmată de distrugerea acesteia;
- prezentarea de către CMH clasa I a epitopilor virali declanșează atacul citotoxic specific al limfocitelor T asupra celulei infectate.

METODE DE DIAGNOSTIC VIRUSOLOGIC ÎN INFECȚIA VHC

Există două situații în care este cerut diagnosticul infecției VHC: screening-ul unei populații cu risc scăzut de infecție (de exemplu, donatorii de sânge), precizarea diagnosticului la pacienți care se prezintă fie cu simptomatologie sugestivă, fie cu factori de risc pentru infecția VHC.

Diagnosticul este inițiat cu teste imunoenzimatic (EIA) de detecție a anticorpilor anti-VHC, urmate de teste suplimentare serologice (RIBA - imunoamprente) sau moleculare, după cum se poate urmări în tabelul 25.VIII.

Testele serologice de screening, bazate pe detecția anticorpilor anti-VHC au redus riscul infecțiilor transmise transfuzional. Seroconversia în sistemul VHC apare însă tardiv, într-un interval de timp extrem de variabil, cuprins între 4 și 10 săptămâni. Această "fereastră serologică" menține riscul transmiterii VHC prin transfuzii.

Testele serologice nu sunt suficient de sensibile pentru a detecta toate persoanele infectate cu VHC. Mai multe limite au fost recunoscute testelor serologice:

- pozitivarea tardivă (la peste 100 de zile postinfecție),
- lipsa de concordanță între pozitivitate și infecțiozitatea pacientului,
- rezultate fals pozitive datorită prezenței unor autoanticorpi.

Cel mai fidel indicator al infecției rămâne evidențierea ARN VHC.

Testele suplimentare de diagnostic pentru infecția VHC se împart în două categorii: teste de detecție a anticorpilor și teste moleculare, pentru ARN VHC. Rezultatele testelor suplimentare pot fi pozitive, negative sau indeterminate. Pacientul este considerat pozitiv anti-VHC atunci când are test EIA pozitiv și teste suplimentare pozitive. Persoanele cu rezultat EIA negativ sau EIA pozitiv asociat cu teste suplimentare negative sunt considerate neinfectate, în lipsa existenței altor dovezi care indică infecție VHC (ca, de exemplu: transaminaze anormale la persoane imunocompromise sau hepatite cu etiologie de cauză încă necunoscută). Rezultate indeterminate la testele suplimentare au fost observate la persoane infectate recent, aflate în plină fază de seroconversie.

TABELUL 25.VIII

METODE DE DIAGNOSTIC VIRUSOLOGIC ÎN INFECȚIA VHC

Testul	Rezultate	Aplicații	Comentarii
TESTE SEROLOGICE	Imunoenzimatice (EIA) Toate rezultatele EIA pozitive trebuie confirmate de un test suplimentar: RIBA, Western Blot, obligatoriu cele cu raport între densitatea optică a probei și prag <3,8	Nu pot diferenția între o infecție acută, cronică sau vindecată	EIA are sensibilitate mare, în populații cu risc scăzut de infecție, dar are valoare predictivă mică, datorită frecvenței falselor pozitivități.
TESTE MOLECULARE	TESTE CALITATIVE RT-PCR (comercial: Amplicor HCV - Roche)	Detecția ARN VHC circulant. Monitorizarea terapiei antivirale	Detecția timpurie a infecției (primele 1-2 săptămâni). O singură determinare negativă nu este concludentă, deoarece detecția ARN VHC poate fi intermitentă
	TESTE CANTITATIVE - RT-PCR (comercial Amplicor HCV Monitor-Roche și Cobas Amplicor HCV Monitor-Roche) - b-DNA (comercial Quantiplex HCV RNA Assay)	Determină încărcarea virală. Util pentru aprecierea rezultatelor terapiei	Nu trebuie folosit pentru excluderea diagnosticului infecției sau pentru aprecierea duratei terapiei

TABELUL 25.VIII (continuare)

Testul	Rezultate	Aplicații	Comentarii
TESTE DE GENOTIPARE	Metode de secvențiere nucleotidică, RFLP, LiPA.	6 genotipuri, peste 90 de subtipuri	Apreciază durata tratamentului și prognosticul asupra răspunsului virusologic susținut

Metodele de detecție a ARN viral care au la bază următoarele tehnici:

- tehnici de amplificare a țintei (sisteme ce produc noi copii ale țintei originale prin RT-PCR), testele folosite comercial fiind Amplicor HCV Monitor-Roche și Cobas Amplicor HCV Monitor-Roche;

- tehnici de amplificare a semnalului, care utilizează procedee de concentrare a markerilor pe sonda moleculară, desemnate în general ca "scheme în pom de Crăciun" (*branched-DNA*); metoda comercial utilizată este Quantiplex HCV RNA Assay.

Alegerea testelor suplimentare se face în funcție de gradul de risc al populației, dar și de dotarea laboratorului. Numai evidențierea VHC ARN indică replicare virală activă și potențial infectant al pacientului. În cursul infecției cronice cu VHC evoluția viremiei este ondulantă, cu alte cuvinte, VHC ARN este detectat intermitent. Tehnicile moleculare se folosesc în numeroase laboratoare, dar nu sunt complet standardizate.

TRATAMENTUL HEPATITEI C CRONICE

Tratamentul hepatitei C cronice vizează fie eradicarea infecției cronice VHC, fie stoparea, respectiv, întârzierea evoluției bolii spre fibroză hepatică, ciroză, insuficiență hepatică sau carcinom hepatocelular. În vederea inițierii și monitorizării unui tratament eficient în infecția cronică cu VHC, trebuie precizate următoarele noțiuni:

Când se inițiază tratamentul?

Inițierea tratamentului este indicată în următoarele condiții:

- transaminaze persistente crescute mai mult de 6 luni;
- nivelul ARN VHC detectabil;
- modificări histologice la puncția-biopsie hepatică de tip inflamație sau necroză moderată și grad scăzut de fibroză hepatică.

Ce înseamnă răspuns bun susținut la tratament?

Răspunsul favorabil poate fi definit în termeni biochimici (normalizarea transaminazelor) sau virusologici (negativarea detecției ARN HCV prin RT-PCR).

Trebuie precizat că un răspuns favorabil nu înseamnă rezultate biochimice sau virusologice bune la terminarea tratamentului, ci

răspuns bun susținut la 6 luni de la încetarea terapiei. Șanse mai mari pentru succesul terapiei există în cazul:

- infecțiilor cu genotip VHC 2 sau 3,
- încărcării virale înaintea începerii tratamentului (baseline) <2 milioane de copii ARN VHC/ml,
- sexului feminin,
- vârstei sub 40 de ani,
- absenței fibrozei portale.

În condițiile în care toți factorii enumerați sunt prezenți, tratamentul se urmează 6 luni, iar dacă există sub 4 factori, se indică continuarea terapiei timp de 12 luni.

Ce înseamnă non responder?

Mentținerea constantă a unui nivel crescut al transaminazelor serice sau detectarea constantă de ARN VHC la pacienți aflați sub tratament definesc starea de *non responder*.

Ce este o recădere?

Scăderea inițială a transaminazelor sau ARN VHC urmată de creșterea ulterioară, în cursul sau la sfârșitul tratamentului, este denumită *recădere*.

Interferonul alfa în combinație cu ribavirina este tratamentul curent pentru hepatita cronică C. Nivelul viremiei condiționează succesul (care este tranzitoriu la valori ale ARN/VHC peste 10^6 genom echivalent/ml).

În prezent, monoterapia standard cu interferon a fost înlocuită cu **tratamentul combinat - ribavirină plus interferon** (ribavirină per os 1 000-1 200 mg/zi; interferon alfa 2b injectabil subcutanat, 3 MIU IFN alfa de 3 ori pe săptămână, pentru o perioadă de 6-12 luni). Terapia combinată crește proporția pacienților ce elimină virusul la 40-50%. Răspunsul susținut după terapia combinată este în jur de 30% la bolnavii cu genotipul 1b VHC și 70% la cei cu genotipurile 1a și 1c. Ribavirina administrată în monoterapie nu induce un răspuns virologic susținut, dar menține și stimulează răspunsul indus de interferon. Noi preparate de ribavirină asigură o farmacocinetică avantajoasă sau minimizează efecte adverse (anemia):

- Viramidin - precursor al ribavirinei activat numai hepatic;
- Levovirin - izomerul levogir al ribavirinei.

Costul terapiei duble, ca și efectele adverse semnificative (anemie, pierdere ponderală, depresie) scad însă acceptul (compliance) bolnavilor pentru tratamente care se pot prelungi 12 -18 luni.

Pentru ameliorarea farmacocineticii interferonului s-a introdus un preparat retard, numit **PegIntron (interferon pegylat)**. Datorită moleculei sale mari, PegIntron este rezistent la proteoliză, ceea ce îi crește timpul de înjumătățire plasmatic. Un avantaj neașteptat al interferonului pegylat este imunogenitatea mai redusă comparativ cu preparatul standard. Studiile clinice au arătat că tratamentul optim

este asocierea *PegIntron* 1-1,5 $\mu\text{g/kg}$ corp pe săptămână cu 1 000 mg/zi ribavirină, timp de 48 de săptămâni. Noi preparate de interferon (albuferon, interferon consens) promit ameliorarea ratei de răspuns la tratament. Alte direcții terapeutice sunt în studiu. Acestea vizează fie modularea răspunsului imun al gazdei prin stimularea sintezei citokinelor T_{H1} , fie inhibarea replicării virale prin:

- inhibitori ai enzimelor virus codificate (proteaza, helicaza, replicaza);
- oligonucleotide antisens, care leagă secvențe specifice ale ARN VHC;
- ribozime ce catalizează ruperea ARN VHC;
- transferul de gene care codifică proteine cu rol în întreruperea asamblării virionilor în hepatocite.

Conducerea tratamentului antiviral necesită o deosebită expertiză ținând seama de noutatea medicamentelor antivirale. Situri pe web pentru decizii terapeutice individualizate pentru fiecare pacient sunt propuse de mai multe asociații, de exemplu: <http://clinicaloptions.com/hepatitis>.

Concluzii

VHC este un virus ARNss de aproximativ 9,5 kb, aparținând familiei flaviviridae, genul hepacivirus. Virusul hepatitei C prezintă șase genotipuri și peste 90 de subtipuri.

Replicarea virală este susținută, chiar și în fazele cronice ale infecției. Fidelitatea scăzută a transcrierii determină dezvoltarea rapidă a quasispeciilor, care reprezintă una dintre cauzele esențiale ale cronizării infecției VHC, ducând la apariția mutantelor virale capabile să eludeze răspunsul imun.

Persistența virală este absolut necesară, dar nu și suficientă pentru apariția hepatitei cronice. Efectul citopatic viral nu este singurul ce determină leziuni hepatice, încărcări virale mari sunt compatibile cu afectare hepatocitară minimă.

Progresia spre hepatită cronică C apare la peste 80% dintre pacienții infectați VHC, iar complicațiile bolii pot agrava evoluția altor infecții cu virusuri transmise parenteral (HIV, VHB, VHD etc.).

Sinteză

Virusul hepatitei C (VHC). Flavivirus - genom ARNss cu regiuni hipervariabile (quasispecii), *rata replicării in vivo*: 10 trilioane (10^9 virioni zilnic); titruri plasmatice >10 milioane copii ARN VHC/ml plasmă.

Cele 9 400 de nucleotide din genom codifică mai multe proteine structurale și nonstructurale. Regiunea 5' a genomului codifică nucleocapsida și două glicoproteine ale anvelopei E1 și E2/NS1 și este mai variabilă. Regiunea 3' a genomului VHC codifică 5 proteine

nonstructurale (NS) care sunt mai constante în secvență. Acestea, împreună cu nucleocapsida, sunt antigenele folosite de testele serologice de diagnostic. Există teste de triaj (screening) de tip imunoenzimatic (ELISA) și teste de confirmare de tip imunoamprente (RIBA) sau teste moleculare. În România, seroprevalența (frecvența) anticorpilor anti-VHC în populația generală este între 3-5%. Persoanele care au primit transfuzii de sânge (mai ales înainte de 1993), care au suferit intervenții chirurgicale sau tratamente parenterale, au o seroprevalență mai mare. Securizarea transfuziei de sânge împotriva transmiterii virusurilor hepatitice (B, C, D) este o problemă mereu actuală.

Condiții asociate cu carcinomul hepatocelular

Hepatita B - infecția cronică este cauza cea mai frecventă a carcinomului hepatocelular.

Hepatita C - la fel de frecvent implicată ca și hepatita B, însă apariția cancerului are o latență mai mare (>25 de ani).

Alcoolismul - facilitează carcinogeneza indusă de infecțiile virale;

Hemocromatoza; tirozinemia; anticoncepționalele; steroizii anabolizanți; ciroza de alte cauze - sunt factori care cresc riscul pentru carcinogeneza hepatică.

BIBLIOGRAFIE

- Feinstone SM et al. Descoperirea hepatitelor postransfuzionale nonAnonB. NEJM 1975;292:767-770.
- Choo QL et al. Clonarea moleculară a virusului hepatitei C din ADNc. Science 1989;244:359-362.
- Pileri P et al. Identificarea CD 81 ca posibil receptor viral. Science 1998;282:938-941.
- Lohman V et al. Replicare VHC în culturi de celule. Science 1999;285:110-113.

VIRUSUL HEPATITEI DELTA (VHD)

De reținut:

Agentul Delta are cel mai mic genom între virusurile animale. Este asemănător viroizilor de la plante. Talie: 36-42 nm, sferic, anvelopat. Componentele structurale sunt: ribonucleoproteina și anvelopa furnizată de lipoproteine ale gazdei și de moleculele AgHBs (furnizate de virusul helper - VHB).

Replicarea este dependentă de infecția mixtă cu VHB care îi conferă structuri (AgHBs) necesare cuplării de receptori hepatocitelor. Coinfecția (infecția simultană) nu este un factor agravant în evoluția

hepatitei B, dar superinfecția (infecția succesivă B-Delta) sporește riscul de cronicizare și de apariție a hepatitei fulminante.

Virusul hepatitei Delta este grupat între agenții subviralii fiind un **virusoid**. Virusozii au un genom mic ARN parțial circular (VHD are 1 700 baze) care este incapabil să codifice proteinele structurale ale virionului. De aceea, replicarea VHD depinde de un virus helper, respectiv, de încapsidarea în AgHBs al virusul hepatitei B. Hepatita Delta survine numai în infecție mixtă cu hepatita B. Fie ambele infecții sunt achiziționate simultan - *coinfecție*, fie succesiv, peste o hepatită B cronică se suprapune infecția delta - *suprainfecție*. Ultima alternativă este o condiție agravantă cu risc de hepatită fulminantă sau de cronicizare. Diagnosticul infecției Delta se face prin evidențierea anticorpilor anti-VHD prin ELISA.

Deși nu există similitudini între genomul VHD și VHB, între cele două virusuri se creează relații diferite în funcție de intervalul în care a survenit infecția. Profilaxia hepatitei Delta se face prin vaccinare împotriva VHB.

BIOLOGIA VHD

Componentele structurale ale virionului VHD sunt ribonucleo-proteina și anvelopa alcătuită din lipoproteine ale gazdei și din molecule AgHBs (furnizate de virusul helper). Genomul este ARNss, circular, cu polaritate antimesaj și cu regiuni terminale complementare genomului VHB. AgHBs conferă genomului VHD capacitatea de a se internaliza și de a ieși din hepatocit. Odată intrat în celulă, genomul VHD se replică autonom, independent de replicarea virusului helper.

Genomul complet are ~1 700 nucleotide care constituie matricea pentru traducerea unei singure proteine: antigenul Delta. Situl replicării virale se află în nucleul hepatocitelor. Internalizarea se face prin endocitoză mediată de același receptor ca pentru VHB. La replicare participă polimeraze ale gazdei (transcriptaza - ARN polimeraza II a gazdei) și polimeraze virale (replicaza virală ARN dependentă de ARN). Asamblarea VHD se produce în citoplasmă asociat cu asamblarea moleculelor libere de AgHBs produse în exces de virusul helper.

Antigenul VHD se exprimă în nucleul hepatocitelor dar numai pe durata persistenței AgHBs. Markerul infecției recente cu VHD este prezența anticorpilor anti-VHD din clasa IgM.

Singura proteină codificată de genomul HDV este antigenul Delta care se poate prezenta în două izoforme: scurt și lung. Cele două izoforme sunt identice ca secvență, cu excepția prezenței unei porțiuni suplimentare de 19 aminoacizi în forma lungă. Aceasta explică și diferențele funcționale între izoforme și, în special, în capa-

citarea lor de a transactiva gene heterologe. Forma lungă poate fi un inhibitor potent al replicării VHB, ceea ce ar explica evoluții atenuate ale coinfecției B-Delta în unele cazuri.

BIBLIOGRAFIE

- Rizetto M, Ponzetto A** Hepatitis delta virus infection: medical aspects. In: The unique hepatitis delta virus, G Dinter-Gottlieb (editor). R.C. Landes Publishing Co., Austin, Texas, USA, 1995, p. 125-139.
- Lai MMC.** The molecular biology of hepatitis delta virus. Annu. Rev. Biochem. 1995;64:259-286.
- Taylor JM.** Human hepatitis delta virus: an agent with similarities to certain satellite RNAs of plants. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1999;239:107-122.
- Gerin JL, Casey JL, Purcell RH.** Hepatitis delta virus. In: Fields Virology, DM Knipe, PM Howley (editors). Lippincott & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2001, p.3037-3050.
- Rizzetto M. et al** Descoperirea antigenului delta în nucleii pacienților cu forme severe de Hepatită B. Gut 1977;18:997-1003.
- Rizzetto M et al** Transmiterea virusului Delta la cimpanzeu numai în prezența VHB.. PNAS 1980;77:6124-6128.
- Sharmeen L et al.** Genomul circular VHD conține o ribozimă. J. Virol. 1988;62:2674-2679.

Site-uri pe web:

www.hepprograms.org

www.immunize.org

www.vaccineinformation.org

VIRUSUL HEPATITEI E (VHE)

De reținut:

Virusul hepatitei E a fost implicat în etiologia unor hepatite nonA nonB transmise pe cale fecal-orală. Agentul etiologic are un genom ARNss similar calicivirusurilor. Spre deosebire de VHA, este labil la stocaj (rezistă numai 4 zile la 4°C). Hepatita E evoluează sever la gravide și contribuie la mortalitatea perinatală. Diagnosticul se face pe baza semnelor clinice și a evidențierii IgM anti-VHE.

Istoric. Prima semnalare a hepatitelor virale determinate de un nou agent transmis pe cale fecal-orală - virusul hepatitei E - aparține cercetătorilor din Moscova. În 1983, Balayan și colab. au obținut prin imuno-electronmicroscopie imagini clare ale unui virus ARN, diferit de enterovirusuri, într-un preparat provenit de la un voluntar care a fost infectat cu filtrat de materii fecale de la un caz cu hepatită enterică

nonA nonB. Ulterior, virusul a fost transmis la maimuțe cynomolgus, a fost clonat, iar genomul secvențiat. Retrospectiv, probe arhivate prelevate în cursul unor epidemii hidrice au revelat circulația VHE încă din anii '50.

Virusul hepatitei E este agentul unor hepatite cu transmitere fecal-orală, frecvente în țările în curs de dezvoltare (India și America Centrală). Importul infecției în Europa nu este exclus.

VIRIONUL

VHE are genom ARNss (7 500 nucleotide) și aparține familiei calicivirusuri. Replicarea VHE urmează modelul caracteristic ribovirusurilor cu genom ARNss cu polaritate pozitivă: calicivirusurile se replică asemănător picornavirusurilor. După decapsidare în citosol, pe matrița genomului parental se transcriu genele nonstructurale și copia complementară negativă, care va forma cu genomul parental un intermediar replicativ necesar pentru sinteza genomurilor progene. Proteine ale gazdei sunt implicate în procesarea (glicozilarea) proteinelor virale în reticulul Golgi. Glicozilarea are un rol important în definirea antigenității. Asamblarea și eliberarea virionilor progeni are loc la nivelul membranei hepatocitului. Hepatocitul este o celulă polarizată, iar eliberarea virionilor VHE se face către canaliculele biliare.

DIAGNOSTIC

Se face pe baza semnelor clinice și a evidențierii IgM anti-VHE. Durata excreției virusului în fecale, ca și durata viremiei nu depășește 28 de zile. În general, după revenirea testelor enzimatice hepatice la normal, contagiozitatea încetează. Hepatita E se remarcă prin gravitatea evoluției la femeile însărcinate. Vulnerabilitatea gravidelor crește cu vârsta gestațională: în ultimul trimestru al sarcinii mortalitatea (prin tulburări de coagulare) atinge 25%. Consecințele infecției VHE la gravide sunt:

- avorturi sau nașteri premature: 12-30% cazuri;
- moartea fătului in utero: 25%;
- decesul mamei prin hepatită fulminantă: 25%.

Hepatita E este cauza unor epidemii hidrice extinse în subcontinentul indian și în America Centrală. Epidemii de zeci de mii de cazuri de hepatită E au fost descrise consecutiv ploilor musonice și inundațiilor. Rata de atac (raportul dintre cazurile simptomatice și asimptomatice) în cursul acestor epidemii a variat între 1 și 15%, mai mare la adulți (3-30%) decât la copii (0,2-10%). Epidemiile cu rata de atac înaltă dau și mortalitate ridicată. În aceleași areale (India,

Pakistan), interepidemic, VHE este responsabil de o proporție însemnată de cazuri sporadice. Distribuția pe grupe de vârstă, severitatea și durata simptomelor, ca și prognosticul sever pentru gravide sunt asemănătoare în zonele endemice cu datele înregistrate în epidemii. În Europa (Italia, Grecia), ca și în Statele Unite, infecția VHE a fost asociată cu călătoriile în zonele endemice. Mai puțin de 1% din hepatitele virale acute sunt hepatite E în zonele neendemice. Surprinzător însă, datele serologice din zonele neendemice indică cifre de seroprevalență mai mari decât cele anticipate (1-5%), ceea ce poate fi atribuit lipsei de specificitate a testelor imunoenzimatiche. Cazuri sporadice sau epidemii locale au fost semnalate și în alte țări în curs de dezvoltare din Asia, Africa sau din Orientul Mijlociu.

Hepatita E - o zoonoză?

Un nou virus desemnat *swine* VHE a fost identificat la porci. Acesta crossreacționează cu anticorpii VHE umani. Porcii peste 3 luni din unele crescătorii prezintă anticorpi, deși nu au și nu au avut semne clinice. Totuși, porcii mai mici de trei luni care au anticorpi prezintă semne minime de inflamație hepatică, ceea ce sugerează evoluția unei infecții numai clinic inaparente. Gena orf2 a VHE porcin are 80% similitudini cu gena VHE uman, iar proteina codificată este cvasiidentică antigenic (peste 90% asemănare în secvența de aminoacizi). Aceste date au sugerat că hepatita E poate fi considerată o zoonoză, deși rolul porcilor ca sursă a infecției umane nu a fost definitiv probat. O problemă pentru viitor, în măsura în care xeno-transplantarea organelor de porc la om va deveni posibilă, este apariția unei xenzoonoze reale.

VHE uman nu a fost cultivat *in vitro*, însă a reprodus boala la macac sau cimpanzeu în urma infecției experimentale. Animalele infectate prezintă transaminaze crescute și modificări histopatologice inflamatorii. Severitatea hepatitei depinde de nivelul încărcării virale. Incubația la animalele inoculate intravenos cu doze infectante 50% pentru maimuță de peste 10^5 este de 3-5 săptămâni. Tot la maimuțe a fost obținută protecția activă (prin vaccinare) sau pasivă (prin transfer de anticorpi) a hepatitei E.

CLINICĂ

Colestaza este simptomul cel mai frapant în hepatita E. Alte simptome frecvente sunt greața, voma, durerea epigastrică. Uneori se impune diagnosticul diferențial cu obstrucția căilor biliare.

Faza icterică începe brusc, coincide cu creșterea transaminazelor și se poate prelungi peste două săptămâni. Histopatologia hepatică relevă infiltrarea spațiului port, colestaza și inflamația sau

degenerescenta lobulară. Hepatita E nu se cronicizează, iar formele cu evoluție fulminantă sunt rare. Gravidele în trimestrul 2 sau 3 de sarcină fac forme severe datorită încărcării virale mari, urmare a replicării virusului în ficatul fătului. De asemenea, s-au descris avorturi și moartea fătului în proporție de 5 la 25%.

PROFILAXIA HEPATITEI E

Este condiționată de ameliorarea sanitației, asigurarea unor surse de apă necontaminate și păstrarea bunei conduite în igiena individuală. O atenție particulară trebuie acordată protecției gravidelor în epidemii. Utilizarea imunoglobulinoprofilaxiei în zonele endemice nu a adus rezultatele așteptate, aceasta fiind o deosebire majoră în raport cu hepatita A. În ciuda încercărilor numeroase, nu există un vaccin eficient. Tentativele făcute au urmat căi moderne în vaccinologie, ca obținerea unor proteine recombinante (orf2 codificate) sau utilizarea ADN complementar genomului VHE.

ALTE VIRUSURI HEPATITICE: VHG (ÎNRUDIT CU VHC) ȘI TTV

Două grupuri independente de cercetători au semnalat în 1995 noi agenți cauzali ai hepatitelor virale. Până în prezent s-au publicat puține date în legătură cu aceste virusuri, ce au primit, provizoriu, denumirea de **virus al hepatitei G (VHG)**. La ora actuală, acesta poate fi pus în evidență doar prin intermediul reacției de polimerizare în lanț și a fost depistat la 46% din consumatorii de droguri, la hemofilici (18%), la bolnavi cu hepatită cronică de cauză neprecizată (9%), precum și la 10% din pacienții prezentând hepatită cronică B sau C. De asemenea, acest virus este prezent în proporție de 1,7% la donatorii de sânge.

Cercetători de la Abbott Laboratories au pus în evidență alte două virusuri-candidat distincte, pornind de la serul unui chirurg (cu inițialele G.B.) ce prezenta icter, în absența unor markeri ai virusurilor hepatitice deja cunoscute. Utilizând acest ser, s-a reușit transmiterea hepatitei la maimuțe tamarin. Prin PCR s-au identificat în serul unor astfel de maimuțe două virusuri (GBV-A și GBV-B), înrudite cu familia flaviviridae.

Aceste date recente confirmă extraordinara premoniție a acad. Șt. S. Nicolau, fondatorul școlii române de virusologie, care în urmă cu peste 50 de ani a formulat ipoteza plurietiologiei hepatitelor virale.

TTv (virus transmis prin transfuzie) este un virus neclasificat, transmis prin transfuzii, probabil parvovirus. Prezența virusului TT

neanvelopat a fost semnalată consecutiv administrării factorului anti-hemofilic neinactivat pentru contaminanți virali. Infecția TT a fost demonstrată prin PCR, cu primeri sintetizați de cercetători japonezi, la 40% din hemofilicii tratați cu produse inactivate; la 75% din cei tratați cu produse neinactivate și la 13-23% în populația generală (tot din Japonia).

Relații interesante au fost demonstrate în cazul *coinfecției HIV cu virusurile hepatitice* nou descoperite:

- VHG este asociat cu o progresie *mai lentă* a infecției HIV și cu menținerea unor valori înalte de limfocite CD4;
- VHC și TTV, dimpotrivă, determină o progresie *mai rapidă* a infecției HIV, chiar sub antiretrovirale, refacerea numărului de limfocite CD4 întârziind.

PARVOVIRIDAE

De reținut:

Virioni mici (18-26 nm), cu simetrie icosaedrică, 32 de capsomere, fără anvelopă.

Genom ADNss, care se încapsidează indiferent de polaritate. Replicarea este inițiată de elemente ale genomului celular sau ale genomului helper.

Parvovirusurile dau infecții latente și interacționează cu virusurile complementare (helper) din familiile herpes- sau adenoviridae. La om, parvovirusurile au fost implicate în *erythema infectiosum* și în crizele aplazice din anemia falciformă.

Istoric. Interesul pentru studiul familiei parvoviridae (vechiul nume: grupul picodnavirusuri) a crescut enorm în ultimii ani, datorită faptului că structura lor simplă și dimensiunile mici ale genomului au permis lămurirea unor aspecte ale replicării virale importante nu numai pentru acest grup de virusuri, ci și pentru replicarea genomului de eukariote.

Popularitatea parvovirusurilor pentru infecționiști a cunoscut un reviriment ca urmare a descoperirii primului parvovirus uman autonom asociat cu o afecțiune pediatrică - *erythema infectiosum*. În plus, argumente convingătoare susțin rolul protector al coinfecției cu parvovirusurile defective în cazul infecțiilor cu adeno- și herpesvirusuri. Similar, parvovirusurile defective din genul dependovirus inhibă potențialul oncogen al adeno- și herpesvirusurilor. Acest ultim aspect împreună cu studiul infecțiilor latente cu parvovirusuri in vivo și in vitro au permis studiul latenței virale la nivel molecular. Din punctul de vedere al importanței pentru sănătatea publică, parvovirusurile nu pot fi ignorate. Patogenitatea excesivă a parvovirusului canin care s-a manifestat epidemic, cu cazuri letale, ridică problema posibilei schimbări de gazdă și a creșterii virulenței unor agenți considerați minori.

Analiza prezentată în continuare nu se va referi decât tangențial la proprietățile parvovirusurilor animale, insistând asupra parvovirusurilor umane și a unor implicații în patologia umană.

CLASIFICARE ȘI PROPRIETĂȚI

Morfologic, virionii prezintă o simetrie icosaedrică, cu 32 de capsomere dispuse pe suprafața unei particule sferice. Parvovirusurile nu au anvelopă. Replicarea are loc în nucleul celulei gazdă și este dependentă de una sau mai multe funcții celulare exprimate în fazele S (tardivă) sau G2 ale ciclului celular.

Infectivitatea parvovirusurilor este stabilă la pH între 3-9 și la 56°C pentru cel puțin o oră. Virusurile nu sunt inactivate de acțiunea solvenților lipidici, însă formolul, beta-propiolactina, hidroxilamina, agenții oxidanți și ultravioletele compromit infectivitatea. Cea mai utilă proprietate pentru detecția parvovirusurilor este hemaglutinarea, comună pentru cele autonome, iar la dependovirusuri prezintă numai la tipul 4.

Parvovirusurile sunt cele mai mici virusuri ADN. Genomul este ADNss, iar capsida icosaedrică are numai 25 nm în diametru. Fiecare virion conține o singură catenă de ADN, fie spira (+), fie (-), ambele specii fiind infectioase. Acidul nucleic are numai 4 700 de nucleotide, însă conține o informație genetică bogată, înalt compactată (mai multe cadre de citire parțial suprapuse).

Familia parvoviridae cuprinde trei genuri:

- Parvovirusuri (PV) autonome.
- Dependovirusuri (PV defective care necesită asocierea cu un virus helper).
- Densovirusuri (PV ale insectelor).

Parvovirusuri autonome

Parvovirusul B19 a fost asociat cu două boli umane:

- erythema infectiosum său a 5-a boală eruptivă a copilăriei ("boala copilului pălmuit" după aspectul faciesului) și
- crize aplazice la copii cu defecte congenitale ale hematogenezei.

B19 utilizează ca receptor antigenul de grup sanguin P și se replică în progenitorii hematogeni din măduva osoasă. La copiii normali determină anemie minoră care poate fi rapid compensată; la copiii cu talasemie sau sferocitoză anemia este severă. De asemenea, infecția parvovirală poate determina anemie cronică la copiii cu SIDA sau la leucemici sub chimioterapie.

Un fapt notabil este **transmiterea transplacentară** a B19 care nu este însă teratogen. Totuși, infecția fătului se poate solda cu complicații: hydrops (edem) fetal sau moarte intrauterină. Diagnosticul diferențial clinic cu o altă viroză redutabilă la gravide - *rubeola* - este foarte dificil, întrucât ambele sunt viroze eruptive.

OMS definește moartea fetală intrauterină (*stillborn*, în engleză) ca feteșii morți după săptămâna 28 (luna a 7-a) de gestație sau

fetușii care au depășit 500 g. Alte virusuri implicate în moartea fetală intrauterină sunt herpesvirusurile (VHS, CMV, HH6, EBV), unele enterovirusuri și adenovirusuri. Protecția fătului în raport cu infecțiile mamei în cursul sarcinii este asigurată pe 3 paliere:

- imunitatea mamei,
- bariera placentală,
- imunitatea fătului.

Răspunsul imun al gravidei este înclinat către răspunsul T_{H2} , ceea ce rezultă într-o oarecare imunosupresie. Imunosupresia protejează împotriva rejecției allogrefei fetale. Datorită dominanței T_{H2} , sinteza anticorpilor materni în cursul sarcinii este inefficientă, facilitând persistența virală. Patogenia infecției fetale cu parvovirusul B19 este marcată de producția eritrocitelor fragile cu semiviată scurtă. Virusul determină oprirea maturării eritrocitelor în faza de normoblast; urmează anemie severă, eritroblastoză și moarte prin insuficiență cardiacă. Infecția parvovirală timpurie în cursul sarcinii poate provoca și avorturi spontane. Acestea au fost asociate cu hiperproducția de citokine inflamatorii, inflamația placentei și compromiterea funcțiilor ei.

Efectul citopatic al parvovirusurilor autonome se manifestă la nivelul nucleului (mai ales în diviziune). Apar incluzii intranucleare, iar nucleolii sunt măriți. Densovirusurile (la insecte) își trag numele de la acest ECP nuclear, hipertrofie cu acumularea unor mase dense intranucleare. Densovirusurile se replică în celulele de larve, nimfe sau insecte adulte fără să fie necesară prezența virusului helper.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Diagnosticul de laborator al infecției acute B19 a gravidei se face fie serologic (prezența anticorpilor IgM), fie molecular, prin amplificare genică. Anticorpii din clasa IgM persistă trei luni, dar acidul nucleic parvoviral poate fi detectat și după dispariția anticorpilor. Acidul nucleic este prezent în sânge, lichid amniotic sau în țesuturile placentale și fetal. După confirmarea infecției parvovirale acute este necesară monitorizarea dezvoltării fătului prin ecografie și luarea unei decizii obstetricale.

Parvovirusuri defective

PV defective pot cultiva numai în coinfecție cu adeno- sau herpesvirusuri. Prezența dependovirusurilor (numite încă virusuri ade-noasociate sau VAA) nu a fost corelată cu vreo boală, dimpotrivă, ele par a conferi un efect protector în raport cu proprietățile oncogene ale herpesvirusurilor. Sunt 7 tipuri de VAA, unele fiind izolate și de la om. VAA sunt extrem de rezistente la îngheț-dezgeț, la pH între 3-9, la liofilizare și la o serie de detergenți. VAA au două feluri

de cicluri replicative: pentru infecția productivă (numai în coinfecție cu herpes sau adeno) sau pentru infecția latentă. În latență, genomul viral se poate integra în genomul celular sau poate persista episomal. Nu mai puțin de 5 gene adenovirale sunt necesare pentru infecția productivă.

VAA sunt un sistem vector atractiv pentru terapia genică, fiind complet lipsite de patogenitate și slab imunogene. În plus, VAA se pot replica în multe tipuri tisulare (inclusiv celulele neuronale care nu se divid) și pot stabili expresia persistentă a informației genetice transfectate. Integrarea genomului VAA este însă o sabie cu două tăișuri: pe de o parte oferă avantajul unui transfer genic permanent, pe de altă parte, inserția fiind *random* în cromozom, ridică riscul mutagenezei inserționale. Utilizarea *in vivo* a transferului genic cu VAA s-a făcut pe modele experimentale pentru boala Parkinson, hemofilie și pentru unele boli neurodegenerative.

O sumă de parvovirusuri la canine sau feline provoacă infecții letale la pui. Trecerea virusurilor de la o specie la alta s-a soldat cu sporirea virulenței. În prezent există vaccinuri parvovirale de uz veterinar.

PATOGENITATEA PARVOVIRUSURILOR AUTONOME

Spectrul afecțiunilor induse de parvovirusuri este extrem de variat de la o specie la alta. Numai câteva exemple vor fi citate, iar comentariul se va referi la implicațiile posibile pentru patologia umană.

Până foarte curând parvovirusurile autonome erau recunoscute ca având un spectru de gazdă limitat. Mai mult, agenții specifici unei specii au o antigenitate distinctă și unică. O abatere notabilă de la aceste reguli a survenit în 1978 cu parvovirusurile canine. În acest an, în zone geografice diferite s-a semnalat difuziunea rapidă a unui parvovirus epidemic la câini. Infecția s-a manifestat fie ca o enterită fulminantă, cu morbiditate și mortalitate foarte ridicate la câinii de toate vârstele, fie ca o miocardită subacută la câței de 3-8 săptămâni. Agentul cauzal a fost etichetat ca parvovirusul canin 2, pentru a-l distinge de primul parvovirus canin izolat. Câteva proprietăți neașteptate au fost evidențiate la acest virus și, în primul rând, asemănarea serologică și genomică cu parvovirusul felin. În consecință, în prezent, agentul epidemic la câini este considerat o variantă cu spectrul de gazdă modificat al parvovirusului felin și nu un parvovirus canin.

Câteva întrebări delicate, dar foarte importante și pentru patologia umană, s-au pus în legătură cu modalitatea de apariție a acestui patogen atât de agresiv:

- agentul epidemic pentru câine este un mutant apărut în natură sau este rezultatul unei presiuni elective impuse (accidental sau deliberat) în laborator, unde a fost adaptat la celule canine?

- ce factori au contribuit la difuziunea pandemică a "noului" patogen care au putut depăși vigilența regulilor de carantină privind importul unor boli veterinare?

- se poate anticipa în continuare o extindere a spectrului de gazdă la alte specii și chiar la om?

Posibilitatea generării iatrogene a noului patogen este considerată cu seriozitate de mulți cercetători. Transmiterea extensivă a fost facilitată de extraordinara rezistență a parvovirusurilor la cele mai nefavorabile condiții. De asemenea, nu este exclusă difuziunea prin produse de uz veterinar, inclusiv vaccinuri virale insuficient controlate. Lecția servită de aceste episoade epidemice impune multă circumspecție în experimentele care, prin introducerea unor presori selectivi, favorizează dezvoltarea unor variante virale cu noi proprietăți biologice. Utilizarea unor culturi de celule diferite de specia gazdă naturală în scopul obținerii unor variante atenuate - nu numai în cazul parvovirusurilor - trebuie atent supravegheată. La fel, utilizarea vaccinurilor atenuate parvovirale trebuie evitată.

INFECȚIA LATENTĂ CU PARVOVIRUSURI

Pentru dependovirusuri elementul caracteristic este absoluta lor defectivitate. În absența coinfecției cu un alt virus ajutător apropiat - adeno- sau herpesvirus - replicarea virusurilor adenoasociate (VAA) nu este posibilă. Acest defect este cu atât mai interesant cu cât virionii VAA se adsorb la celula gazdă, pătrund în nucleu, sunt decapsidați, dar replicarea nu este detectată. Continuitatea genomului VAA este totuși asigurată datorită abilității de a stabili infecții latente până când coinfecția cu virusul ajutător permite sinteza progenilor.

Infecția latentă cu VAA a fost descoperită ca urmare a noilor recomandări privind detectarea virusurilor endogene în substratul celular utilizat în producția vaccinurilor virale. Dintre cele două posibilități de existență a genomului viral latent în celula gazdă - integrat sau plasmidian - prima alternativă a fost bine argumentată. Integrarea ADN genomic al parvovirusurilor se face ca un tandem linear specific pentru secvențele terminale. Mecanismul molecular al reactivării VAA este incert, însă cele mai plauzibile modele presupun fie excizia prin recombinare, fie un mod selectiv de replicare al secvențelor integrate.

Care sunt consecințele latenței VAA pentru gazdă? În nici una din speciile de la care dependovirusurile au fost izolate nu s-a notat asocierea cu o boală. Dimpotrivă, se pare că infecția latentă cu VAA conferă gazdei un oarecare efect protector, ceea ce a fost demonstrat prin inhibiția replicării adenovirusurilor sau herpesvirusurilor ajutoare și a oncogenității lor.

Pentru parvovirusurile autonome, infecția clinică latentă este o regulă. Prezența anticorpilor specifici denotă o stare de purtător și nu absența parvovirusurilor. Mecanismul persistenței este necunoscut, dar sediul ei pare să fie în celule mature care nu se divid. În celulele care se multiplică, ca, de exemplu, în rănilor care se vindecă, sau în celulele canceroase are loc reactivarea parvovirusurilor latente. Reamintim că inițial, în anii '60, interesul virusologilor pentru parvovirusuri a fost legat de frecvența lor asociere cu tumorile maligne. Astăzi știm sigur că parvovirusurile nu au potențial oncogen ci, dimpotrivă, afinitatea lor pentru celulele în mitoză le conferă un potențial oncolitic.

INTERACȚIUNEA CU VIRUSURILE COMPLEMENTARE

Defectivitatea dependovirusurilor este baza selecției intime pe care o stabilesc cu virusurile ajutătoare: adenovirusuri, care constituie "helperul" natural, sau herpesvirusuri. Deși din punct de vedere structural nu există nici o relație cu virusurile ajutătoare, dependovirusurile se comportă ca particule defectiv interferente. Într-o infecție litică, diferitele tipuri de virusuri adenoasociate (VAA) au o acțiune inhibitorie asupra replicării adeno- sau herpesvirusurilor. În plus, s-a demonstrat autointerferența între diferitele serotipuri de VAA.

Deși oncogenitatea adenovirusurilor nu a fost argumentată la om, capacitatea unor serotipuri umane de a determina tumori la hamster in vivo sau transformarea celulară in vitro este bine cunoscută. Tumorile sunt sarcoame nediferențiate, iar unele adenovirusuri au un mare potențial oncogen - serotipurile 12, 18 și 31. Studii moleculare au precizat porțiunile genomului adenoviral care induc transformarea malignă. Astfel a devenit posibil studiul interacțiunilor moleculare adenovirusuri - VAA, care se concretizează în inhibiția potențialului oncogen al adenovirusurilor. Neașteptat, s-a demonstrat că acțiunea inhibitorie nu este condiționată de replicarea VAA. În general se admite că infecția concomitentă cu VAA servește la moderarea virulenței infecției adenovirale in vivo. În ceea ce privește inhibiția oncogenității, ea este urmarea reducerii expresiei antigenului T. Inhibiția potențialului oncogen al herpesvirusurilor prin VAA este argumentată de unele date seroepidemiologice la om. Incidența anticorpilor anti-VAA este scăzută la pacienții cu cancer de col uterin, de la 80% la martor, la 14% la grupul cu leziuni maligne. Pacienții infectați cu herpes prezintă risc sporit pentru dezvoltarea leziunilor maligne dacă nu sunt infectați și cu VAA.

SEMNIIFICAȚIA CLINICĂ A PARVOVIRUSURILOR UMANE

Mai multe tulpini de parvovirusuri au fost izolate din specimene clinice umane. Stabilirea unei relații etiologice cu stări morbide concrete a întârziat însă. Mai mulți autori au incriminat parvovirusurile umane în crizele aplazice din anemia falciformă. La bolnavii cu forma homozigotă de drepanocitoză, infecția se însoțește de depleția măduvei în precursori eritrocitari și de dispariția reticulocitelor circulante. La subiecții normali, unde durata de viață a hematiei periferice este de 120 de zile, depleția în precursorii eritrocitari consecutivă infecției virale este tardiv și numai pasager remarcată. La cei cu anemie falciformă, cu hematii cu o durată de viață de numai 10-15 zile, depleția în precursori determină rapid criza aplazică. În reticulocite și în hematiile mature parvovirusurile nu se replică.

O altă determinare clinică asociată infecției cu PV este eritemul infecțios sau "boala a 5-a, febrilă" a copilăriei. Infecția pare a fi transmisă pe cale fecal-orală, deși transmiterea parenterală nu poate fi exclusă, ținând seama de incidența ridicată a anticorpilor anti-PV la politransfuzati.

Concluzii

Parvovirusurile autonome și cele defective sunt două genuri asemănătoare, dar care prezintă câteva diferențe biologice semnificative. Cele autonome nu stabilesc infecții latente, în timp ce latența este determinantă în replicarea parvovirusurilor defective. Toate parvovirusurile autonome sunt patogeni redutabili la gazda naturală, iar adaptarea lor (naturală sau în laborator) la alte gazde prezintă riscul accentuării patogenității. Parvovirusurile defective nu au atribute patologice, dar activarea lor de către virusuri complementare oncogene poate conduce, în mod neașteptat, la diminuarea oncogenității.

Sinteză

Virionul parvovirusurilor este icosaedric, neanvelopat, diametrul 20-25 nm. Capsida conține 4 polipeptide. 80% din populația virală conține virioni cu catena ADN noncodantă (polaritate negativă), iar 15% cu catenă pozitivă. Sunt, de asemenea, și virioni fără genom. Virionii sunt rezistenți la căldură, cloroform, pH acid.

Genomul parvovirusurilor este ADNss linear, 4,2 kb, cu două cadre de citire. Genomul formează structuri tridimensionale în ac de păr datorită unor secvențe ITR (*invers terminal repeat*). Genomurile cu polaritate diferită sunt asamblate separat.

Replicare: internalizare prin receptor neidentificat, situl replicării în nucleu. Transcriptaza: polimeraza ADN celulară. Replicaza: ADN polimeraza virală (nickaza) care are ca primer *hairpin*-ul 3' terminal.

Genomul parvovirusului adenoasociat (VAA) are un locus specific de integrare în cromozomul uman 19.

Boli asociate: erythema infectiousum, crize de anemie aplastică, hydrops fetalis.

BIBLIOGRAFIE

Atchison RW et al. Primul VAA caracterizat. Science 1965;194:754-56.

Cossart YE et al. Descoperirea parvovirusului B19 (gen erithrovirus). Lancet 1975;1:72-73.

Pattison JR et al. Asocierea infecției parvovirale cu crizele de anemie aplastică Lancet 1981;1:664-665.

Anderson MJ et al. Asocierea infecției parvovirale cu erythema infectiousum. J. Hyg. 1984;93:85-93.

Bansal GP et al. Vaccin recombinant experimental în sistem baculovirus. J. Infect. Dis. 1993;167:1034-1044.

Wagner JA et al. VAA în trialuri clinice pentru "integrare țintită". Lancet 1998;351:1702-1703.

HEPADNAVIRIDAE

De reținut:

Hepadnavirusurile sunt caracterizate de:

- tropism limitat pentru hepatocit;
- dezechilibru între sinteza particulelor complete (infecțioase, cu genom) și a celor vide (noninfecțioase). Concentrația virionilor compleți în serul bolnavilor atinge $>10^9/\text{ml}$ iar a particulelor noninfecțioase $10^{14}/\text{ml}$;

- frecvența infecției persistente cu producția continuă de virioni.

Genomul ADNds, parțial circular, cu dimensiuni mici (3 200 nucleotide) este foarte eficient organizat. Prezența orf suprapuse permite codificarea a 50% proteine în plus în raport cu ceea ce ar fi teoretic posibil. Replicarea genomului implică o etapă de reverstranscriere din care rezultă un ADNc mai mare decât genomul viral care se poate integra în genomul celulei gazdă.

Istoric. Infectivitatea deosebită a virusului hepatitei B (VHB) se datorează concentrațiilor plasmatice excesive (atât la bolnavi, cât și la purtătorii asimptomatici), precum și căilor multiple de transmitere (contact direct, parenterală, sexuală, verticală etc.). Câteva epidemii iatrogene sunt legate de administrarea unor preparate (mai ales, seruri și vaccinuri), conținând derivate din sânge contaminat: epidemia marinarilor din Bremen, 1885; epidemia din armata britanică, 1937; culminând cu epidemia din armata americană din 1942, consecință a vaccinării antiamarile (anti-febră galbenă) cu 28 000 de cazuri și 62 de decese.

CLASIFICARE

Virusul hepatitei B sau particula Dane (fig. 27.1) de 42 nm aparține familiei hepadnaviridae, fiind un virus cu genom ADN parțial dublu catenar și parțial circular, cu anvelopa cu antigenitate complexă. Alte hepadnavirusuri au fost descoperite la mamifere: marmotă și

specii de veverițe (*Marmota monax* și *Spermophilus beecheyi*) și la păsări (rața domestică). Hepadnavirusurile mamiferelor și păsărilor reprezintă două genuri distincte. Virusurile aviare au numai 3 gene, virioni mai mici și antigenitate distinctă. Hepadnavirusurile sunt înrudite cu alte familii virale, între care retrovirusurile. Există asemănări în funcționalitatea genomului viral la retro- și hepadnavirusuri și chiar similitudini genomice în secvențele care codifică reverstranscriptaza. Din aceste asemănări derivă sensibilitatea ambelor virusuri - HBV și HIV - la unele medicamente antiretrovirale

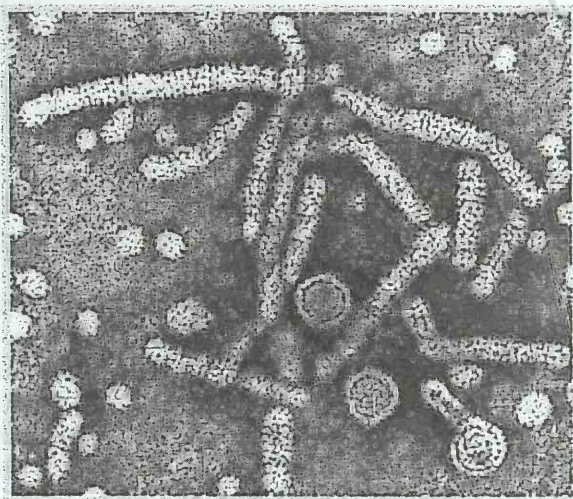


Fig. 27.1. Virionii VHB sunt fie particule complete hexagonale (Dane) de 42 nm care încapsidează acidul nucleic viral, fie particule mici (sferice sau filiforme) rezultate din autoasamblarea moleculelor de AgHBs sintetizate în exces. Aceste ultime particule, cu diametrul de 22 nm, nu conțin ADN VHB, nu sunt infectante, ci numai imunogene.

PROPRIETĂȚILE VIRUSULUI

La exterior, VHB prezintă o anvelopă glicolipidoproteică care are epitopi multipli, numită antigen de suprafață - AgHBs (fostul antigen Australia). În serul bolnavilor se găsesc diferite forme ale acestui antigen: particulele omogene, sferice, de 42 nm, care reprezintă virionul complet (numite particule Dane), și particule neomogene, sferice sau filamentoase (cu diametrul de 22 nm) constituind structuri lipsite de ADN și, deci, de infectivitate.

Cu ajutorul detergenților se poate separa AgHBs de nucleocapsidă, care are un diametru de 28 nm și prezintă la suprafață reactivitatea antigenului de centru - AgHBc. În interiorul nucleocap-

sidei se găsesc: ADN viral (3 200 nucleotide), ADN polimeraza, revers-transcriptaza și protein kinaza VHB. Virusul are cel puțin trei sisteme antigenice asociate: AgHBs, AgHBc, AgHBe, care sunt urmărite pentru diagnosticul serologic.

Genomul VHB este ADN parțial dublu catenar, cu o spirală lungă (L, negativă) și una scurtă (S, pozitivă). Pe spira lungă se găsesc genele ce codifică proteinele VHB.

AgHBs mediază atașarea la receptorii celulari și este implicat în virus-neutralizare. Polipeptidele codificate de regiunea S conțin antigene pentru specificitatea de grup și subtip a VHB. Cel puțin opt subspecificități antigenice ale AgHBs, având o distribuție geografică inegală, au fost descrise. Subtipurile sunt condiționate de:

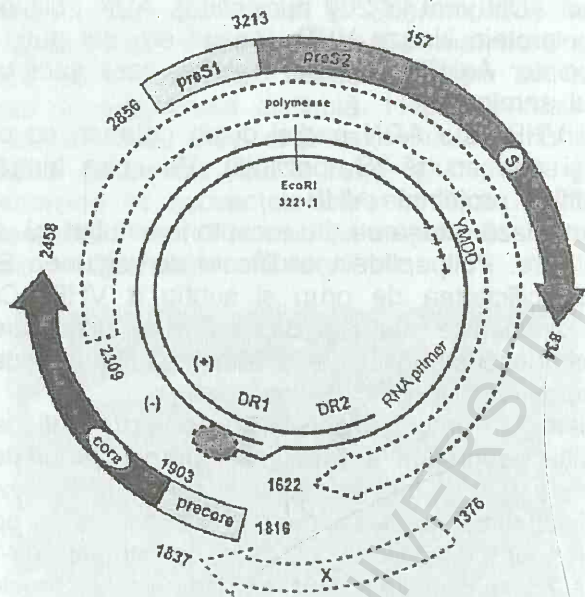
- un determinant specific de grup (a);
- două perechi, mutual exclusive, de determinanți de subtip (*d, y* și *w, r*). Distribuția geografică a subtipurilor permite anumite interpretări epidemiologice; la noi în țară predomină constelațiile *ayw* și *adw*.

Genomul codifică patru cadre de citire (*orf* - *open reading frames*) parțial suprapuse, ceea ce face ca mutații într-un punct al genomului să afecteze simultan două sau trei gene. Genele VHB codifică (fig. 27.2, tabelul 27.1):

- Antigenul de suprafață AgHBs (gena S) cu trei componente: $\text{preS}_1 + \text{preS}_2 + \text{S}$.
- Antigenul de centru AgHBc (gena c) care prin clivare produce AgHBe (marker de infectivitate).
- Reverstranscriptaza (gena pol).
- Factori transactivatori ai unor gene celulare (gena X, implicată în cancerizare).

Replicarea VHB cuprinde o etapă de reverstranscriere. După completarea secvenței spirei scurte, pe matrița ADNds se sintetizează o copie ADN circulară relaxată (DNAccc - DNA *closed covalent circular*), care este transferat în nucleu în formă episomală, neintegrată cromozomial. Pe acest ADN se sintetizează un ARN relaxat, numit ARN pregenomic. Acesta servește fie ca ARNm pentru sinteza proteinelor virale, fie ca matriță pentru reverstranscriptaza care va sintetiza genomul progen. Caracteristic pentru VHB este sinteza disproporționată între particulele virale complete (particulele Dane) cu genom și cele vide. Acest fapt este rezultatul producției proteinelor virale în exces (1 014 copii) în comparație cu numai 108 copii ADN viral. Procesul de reverstranscriere care se produce în citoplasmă este ținta antiretroviraletor utilizate în tratamentul hepatitei B.

Secvențierea genomului VHB a indicat existența a 8 genotipuri (de la A la H) cu o anumită prevalență geografică. Prezența mai multor genotipuri în același spațiu reflectă traseele majore ale imigrației.



- 4 overlapping open reading frames
- Reverse transcriptase/DNA polymerase domain overlaps with surface gene

Fig 27.2. Genomul VHB este ADNds parțial circular. Cele 3 cadre de citire (orf) mai scurte sunt suprapuse parțial cu gena pentru polimerază (pol). Mutațiile în gena pol induse frecvent de noile medicamente antivirale modifică și celelalte gene. Genomul codifică patru proteine: AgHBs (anvelopa virală), polimeraza virală, proteina core și proteina X nestructurală. Anvelopa preia lipide din celula gazdă. Gena S (pentru AgHBs) codifică trei proteine de suprafață (S) distincte: mare, medie și mică. S-a sugerat că proteinele X și medie intervin în carcinogenează.

TABELUL 27.1

GENOMUL VIRUSULUI HEPATITEI B (VHB)

Gena	Proteinele	Numărul de aminoacizi	Funcții	Comentarii
preS ₁ + preS ₂ + S	AgHBs (Large)	108 + 55 + 226	Imunogenă, protectoare, mai mulți determinanți Ag	Subtipuri datorate antigenelor a și d/y sau w/r ultimele, mutual exclusive
preS ₂ + S	Medium	55+226		
S	Major	226		
preC + C	AgHBc (core)	29+183	Induce Ac non-protectori	Participă în hepatocitoliză
pol	Polimeraza revers-transcriptaza	832	Funcție RT-aza	
X	Transactivatoare	154	În transcriere	În carcinogenează

VHB este foarte rezistent la stocare, la fierbere, la dezinfectante.

Transmiterea VHB se face pe cale:

- Parenterală (prin injecții, transfuzii, manevre stomatologice sau chirurgicale etc.).

- Sexuală.

- Materno-fetală (perinatal și nu transplacentar).

- Prin contact de la bolnav sau de la secrețiile acestuia.

- Transcutanat etc.

Calea principală de transmitere în regiunile endemice, precum România, este perinatală și prin contact. Aici infecția survine mai frecvent timpuriu în copilărie. În țările cu endemie joasă (Uniunea Europeană, S.U.A., Canada) transmiterea survine la adulți, în principal pe cale sexuală. Vaccinarea aplicată nou-născuților, dar și restului populației reușește să scadă dramatic incidența hepatitei B. De exemplu, în Alaska, 15 ani de campanie de vaccinare susținută a scăzut incidența de la 35 la 3% (tabelul 27.II).

TABELUL 27.II

PREVALENȚA GEOGRAFICĂ A GENOTIPURILOR VHB

Genotip	Areal	Genotip	Areal
A	Africa, India, Europa de Nord, S.U.A.	E	Africa de Sud și Vest
B	Asia, S.U.A.	F	America Centrală și de Sud
C	Asia, S.U.A.	G	Europa, S.U.A.
D	India, Orientul Mijlociu, Europa de Sud, S.U.A.	H	America Centrală și de Sud, California

Hepatita B este una din infecțiile cel mai frecvent transmise prin acte medicale invazive (infecții iatrogene). Sterilizarea defectuoasă a instrumentelor, re folosirea seringilor dar, mai ales, transfuzia de sânge sau derivate (*necontrolate*) permit infecții iatrogene regretabile. Legislația actuală statuează obligativitatea îndepărtării de la donarea de sânge sau de organe a subiecților purtători de AgHBs.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Diagnosticul infecției acute, dar și evoluția și prognosticul formelor cronice pot fi stabilite prin urmărirea markerilor serologici asociați infecției cu VHB.

AgHBs apare încă din incubajie și ar trebui să dispară la 3 luni de la infecție. Persistența lui la așa-numiții purtători sănătoși sau

simptomatici (peste 10% din foștii bolnavi în România) face ca acest marker să nu indice totdeauna o infecție recentă. Purtătorii se recoltează mai frecvent dintre copii (infecțați la naștere sau mai târziu), dintre bolnavii de sex masculin și dintre imunosupresați (dializați, transfuzați, cu infecții mixte cu HIV, CMV etc.). Nivelul ridicat al antigenemiei (asociat cu prezența AgHBe și a ADN/VHB), ca și îmbolnăvirile acute recente sugerează totdeauna un grad ridicat de infectivitate al purtătorilor.

AgHBe reflectă replicarea activă a VHB, infecție cu prognostic sever pentru bolnav și risc mare de transmitere pentru anturaj. AgHBe este distinct atât de virionul complet, cât și de AgHBs liber, fiind un antigen solubil (provenit din clivarea AgHBc), a cărui prezență este paralelă cu a altor markeri care reflectă replicarea activă: ADN/VHB și ADN polimeraza virală. În plus, complexe AgHBe - IgG anti-HBe sunt implicate în inducția glomerulonefritei și a altor manifestări (extra-hepatice) imunopatologice din hepatita B. Copiii născuți de mame purtătoare de AgHBe devin invariabil infectați persistent.

AgHBc nu apare în plasmă, el găsindu-se exclusiv în hepatocit (nucleu, membrana celulară sau citoplasmă).

Anticorpul anti-HBc sunt primii care apar; apartenența lor la clasa IgM impune diagnosticul de infecție recentă. Anti-HBc persistă indefinit, reprezentând un marker al trecerii prin boală. Persistența unor titruri semnificative de anti-HBc de tip IgM este caracteristică infecției cronice cu replicare continuă de virus și evoluției unor leziuni hepatice. De aceea, pe lângă semnificația diagnostică, acest marker este util și în monitorizarea evoluției bolnavilor.

Anticorpul anti-HBe apar în cazul unor infecții autolimitante, cu prognostic bun. Conversia către sinteza anti-HBe este paralelă cu dispariția ADN/VHB, ceea ce sugerează încetarea replicării virale.

Anticorpul anti-HBs apar tardiv, la 4-6 luni de la debutul infecției. AgHBs și anti-HBs sunt markeri mutual exclusivi. Primii care apar sunt anticorpul anti-preS2. Între declinul AgHBs și momentul evidențierii anti-HBs există o perioadă numită "fereastra serologică", în care nu este posibilă detecția acestor markeri decât prin studii moleculare. Complexele imune - AgHBs și anti-HBs - au fost incriminate în citoliza hepatocitelor și au rol patogen, VHB nefiind un virus citolitic. Apariția anti-HBs semnifică evoluția spre vindecare, cu sistarea replicării virale. Anticorpul anti-HBs sunt seroneutralizanti și protejează subiectul de o nouă infecție cu VHB. Prezența anti-HBe, în absența seroconversiei în sistemul AgHBs - anti-HBs, reflectă probabil integrarea ADN/VHB în genomul celular.

Definiția clinică a bolii stabilește debutul discret al simptomelor (anorexie, oboseală) și icter sau/și creșterea nivelului transaminazelor. Criteriile de laborator pentru confirmarea infecției HBV acute sunt:

- Prezența anticorpilor anti-hepatită B (antigenul de centru) - anti-HBc (clasa IgM).
- Prezența antigenului de suprafață - AgHBs.
- Absența anticorpilor anti-hepatită A din clasa IgM (IgM anti-HAV negativ).

Vindecarea este urmarea sintezei anticorpilor anti-AgHBs, **singurii** care neutralizează replicarea virală. Persistența în stadiul 4 a AgHBs, AgHBe sau ADN/VHB denotă cronicizarea.

Mutante VHB

Mai important, din punct de vedere al relației virus - gazdă sunt 3 stadii succesive ale evoluției infecției VHB: faza de imunotoleranță, faza de clearance imun și faza de purtător (carrier) cu sau fără reactivări. Apariția mutantelor VHB este cauza reactivărilor. Rata de mutații în genomul VHB este de 10 ori mai mare decât la alte dezoxiribovirusuri datorită etapei de reverstranscriere. Șase grupe de mutante (care apar în mod natural sau după vaccinare sau administrarea de antivirale) au relevanță clinică:

- genotipul sălbatic (*wild*), prevalent natural (wVHB);
- mutantele precore;
- mutantele în regiunea promoterului core;
- mutante AgHBs induse rarism de vaccin,
- mutantele YMDD (tirozină-metionină-aspartat-aspartat) induse de tratamentul cu lamivudină;
- mutantele N236T (substituții asparagină → threonină) induse de tratamentul cu adefovir.

Mutantele precore sunt excepționale la genotipul A, sunt frecvente la genotipul C (>50%) sau D (>70%). Recăderile sunt asociate cu prevalența mutantelor în raport cu wVHB. Mutantele (din ce în ce mai frecvente) **precure** sau **core-promoter** (vezi mai jos) abolesc, respectiv, diminuează drastic producția AgHBe. Răspunsul imun anti-HBe este presorul selectiv pentru favorizarea mutantelor care eludează efectorii imuni (*escape mutants*). În aceste cazuri singurul marker fidel al replicării virale este determinarea încărcării virale, a numărului de copii ADN/VHB.

Determinarea încărcării virale în hepatita B

Alături de evidențierea AgHBs și AgHBe, determinarea numărului de copii ADN/VHB constituie un marker mai precoce și mai sensibil al replicării virale active. Utilitatea lui diagnostică este evidentă în cazul infecțiilor cu mutante AgHBe negative, ca și pentru evaluarea eficacității tratamentului antiviral. Utilitatea prognostică este în curs de evaluare și depinde de adoptarea unei metodologii standardizate de diagnostic (tabelul 27.III).

TABELUL 27.III

INDICAȚIILE ȘI LIMITELE DETERMINĂRII ADN/VHB

Indicator timpuriu al infectivității (chiar și în cazul mutantelor)
Monitorizarea terapiei antivirale
Detecția și confirmarea apariției mutantelor rezistente (nestandardizat)
Markerul direct - "standardul de aur" al replicării VHB
Evaluarea evoluției în hepatita cronică (corelații clinice în curs)
Confirmarea remisiunilor sau coinfecțiilor (prag în curs de evaluare)

Trusele actuale de detecție ale ADN/VHB se bazează pe una din cele două strategii cunoscute de la determinările pentru HIV sau VHC:

- amplificarea semnalului (tehnici de amplificare cu ADN polimerizat, ramificat - bDNA - *branched DNA*);
- amplificarea țintei (tehnica de amplificare PCR).

Progrese semnificative în reacția de polimerizare în lanț (PCR) sunt reprezentate de tehnologia PCR *real time*, tehnologia Taq Man și tehnologia semnalelor moleculare. Aceste metode noi reduc timpul de lucru, reduc riscul contaminării între probe și cresc acuratețea și accesibilitatea determinărilor.

O comparație între strategiile clasice este redată în tabelul 27.IV.

TABELUL 27.IV

PRAGUL DE DETECȚIE AL METODELOR DE DETERMINARE ADN/VHB

Metoda de determinare	Prag inferior copii ADN/VHB	Dezavantaje
Hibridizare (bDNA)	10 000-50 000	Prag ridicat
Amplificare (PCR)	100-500	Reproductibilitate incertă

TABELUL 27.V

PRINCIPALELE CARACTERISTICI ALE FAZELOR INFECȚIEI VHB

Faza infecției	Copii ADN/VHB	Transaminaze	Alți markeri ai replicării
Acută	$>10^7 - 10^8$	Crescute	AgHBs; AgHBe
Seroconversie	10^4	Crescute	AgHBe $\rightarrow$ antiHBe
Hepatită cronică AgHBs (+)	10^5	Normale/crescute	AgHBs
Hepatită cronică AgHBs (-)	10^4	Normale/crescute	Prognostic rezervat când AgHBs(-)
Ciroză	$10^5 - 10^6$	Crescute	AgHBs
Ciroză decompensată	$10^5 - 10^6$	Crescute	AgHBs

TEHNICI DE MONITORIZARE A REZISTENȚEI LA ANTIVIRALE

Emergența mutantelor VHB rezistente la antivirale este anunțată de dispariția semnelor de ameliorare a funcțiilor hepatice, apariția unor

simptome de hepatită acută care pot merge până la decompensare hepatică și, în final, deces. Mai mulți factori cresc probabilitatea emergenței mutantelor VHB: încărcarea virală înaltă, supresia moderată a replicării virale în urma administrării îndelungate a unui singur medicament antiviral, existența unor mutații crossrezistente pentru mai multe antivirale. O noțiune importantă este bariera genetică a rezistenței sau numărul de mutații suficiente pentru emergența rezistenței.

Modificările în secvența de aminoacizi a polimerazei VHB care conferă rezistența la analogii nucleoz(t)idici sunt considerate mutații și nu variante. Rezistența genotipică se referă la identificarea acestor mutații. Rezistența fenotipică presupune demonstrarea scăderii sensibilității la antivirale prin tehnici in vitro.

După infecția VHB acută, majoritatea bolnavilor rămân pentru 2-4 săptămâni AgHBs pozitivi, cu încărcare virală mare (peste 10⁹-10¹⁰ copii VHB/ADN), transaminaze normale, activitate histologică hepatică minimă și simptome moderate. Aceasta este faza de toleranță imună. Bolnavii sunt foarte contagioși în incubajie și în primele 3-4 săptămâni de la debut. După dispariția efectului tolerogen urmează faza de liză hepatică imun-mediată (clearance): scade încărcarea virală, dar cresc transaminazele și anticorpii în ordine: anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs. Faza de clearance poate dura luni sau ani. Urmează faza de purtător, în care VHB/ADN este nedetectabil, transaminazele sunt normale sau puțin crescute, iar leziunile hepatice minime. Cei mai mulți pacienți rămân în faza de purtător inactiv toată viața. Condiții asociate (coinfecții, imunosupresii etc.) pot însă precipita reactivările: crește VHB/ADN, activitatea histologică hepatică devine agresivă, cresc transaminazele. Seroreversia anti-HBe → AgHBe poate surveni (tabelul 27.V).

EPIDEMIOLOGIA HEPATITEI B

Următoarele date epidemiologice indică hepatita B ca problemă globală, prioritară, de sănătate publică:

• Subiecți cu serologie pozitivă	2 miliarde
• Purtători cronici	0,35 miliarde
• Subiecți cu complicații grave	0,5 miliarde
• Mortalitate anuală	0,5-1,2 milioane

Prevalența hepatitei B variază geografic, fiind definite zone cu endemie ridicată (>8% din populație sunt purtători cronici de virus), cu endemie medie (2-7%) și scăzută (<2%). România este o țară cu endemie ridicată, în ciuda implementării programului național de vaccinare anti-HB care vizează din 1997-1998 noile generații de copii. O serie de factori demografici recenți asociați tranziției și, în special, circulația internațională a persoanelor din și în România creează

premisele menținerii sau introducerii în țară a unor tulpini virale cu genotipuri noi. Trebuie menționat că zona Asia - Pacific are endemia cea mai ridicată, 75% din purtătorii cronici de VHB trăind aici.

Trei elemente importante caracterizează evoluția hepatitei B în zonele cu endemicitate înaltă:

- 75-90% din populație prezintă markeri serologici atestând infecția recentă sau veche (eventual ocultă);
- infecția timpurie survine înainte de vârsta de 5 ani (de obicei, asimptomatică) și prezintă risc sever de cronicizare;
- rata mare a persoanelor adulte cu complicații grave (hepatită cronică, ciroză, cancer) ale hepatitei B.

Omul este singura gazdă a infecției. Sângele, dar și alte fluide ale corpului (saliva, sperma etc.) constituie sursa de infecție. VHB nu se transmite prin alimente contaminate, apă sau insecte vector. Căile principale de transmitere sunt: perinatală, sexuală și parenteral/percutană. Deși transmiterea prin transfuzii sau prin manevre invazive (injecții, endoscopii, stomatologie etc.) este azi mai bine controlată, există încă un risc asociat acestor procedee, precum și căi de minimalizare a riscului, care așteaptă să fie implementate în România.

Transmiterea perinatală continuă să persiste în România în ciuda programului de imunizare a nou-născuților. Schema completă de vaccinare nu este totdeauna aplicată corect, iar în cazurile indicate asocierea imunoglobulinoprofilaxiei specifice nu este financiar posibilă.

Riscul transmiterii materno-fetale în absența vaccinării este de 70-90% în cazul mamelor cu AgHBe prezent și de 10-30% pentru mamele AgHBe negative, dar ADN/VHB pozitive. Transmiterea materno-fetală are loc ante-partum (transplacentar), intra-partum (în cursul nașterii) sau post-partum (mai ales prin alăptare). Din fericire, transmiterea transplacentară (care nu poate fi prevenită prin vaccinare) este responsabilă de numai o cincime din infecțiile neonatale. Cele mai frecvente cazuri de transmitere transplacentară se produc în cazul nașterilor premature și sunt datorate leziunilor la nivelul vilozităților choriale sau chiar infecției virale a țesutului placentar. Ținând seama că achiziția infecției VHB în primul an de viață este asociată cu 90% risc de cronicizare, copiii infectați timpuriu trebuie atent monitorizați. Cauza cronicizării frecvente este inducerea toleranței la virus în cazul infecției fetale.

Transmiterea sexuală a făcut ca mulți autori să considere infecția VHB o boală sexual transmisă (STD), cu toate implicațiile privind detecția sursei și implementarea măsurilor de protecție. La heterosexuali, riscul achiziției VHB este asociat cu numărul partenerilor sexuali, cu istoricul altor boli STD în antecedente și cu serologie pozitivă pentru lues. La homosexuali, riscul este și mai mare, 70% dintre ei infectându-se după 5 ani de activitate sexuală. În toate cazurile,

sexul neprotejat, sexul cu prostituate, sexul cu consumatori de droguri implică risc accentuat de infecție.

Transmiterea parenteral/percutană este frecvent iatrogenă (dar nu numai!). Transfuziile, dializa, acupunctura, tratamentele stomatologice, injecțiile frecvente efectuate de personal necalificat, în ambulator, sunt proceduri regăsite în antecedentele subiecților infectați. Introducerea screeningului viral pentru sânge și derivate, a practicilor corecte de efectuare a intervențiilor parenterale, a metodelor controlate de dezinfecție/sterilizare a instrumentarului au scăzut, fără a elimina, riscul transmiterii parenterale. Acest risc este de 3 ori mai mare decât pentru hepatita C și de 30 de ori mai mare decât pentru infecția HIV. Site-uri girate de OMS oferă informații suplimentare: www.safetyinjection.org.

Personalul medical este la risc pentru achiziția parenteral/percutană a hepatitei B, iar vaccinarea se impune încă de la intrarea în carieră. Alte profesii expuse sunt: tehnicienii din laborator, polițiștii, pompierii, personalul paramedical din ambulanțe, personalul de îngrijire din hoteluri și spălătorii. Practici mai noi, ca piercingul sau tatuajul, dar și cele clasice, ca manichiura, cosmetica favorizează infecția.

Achiziția infecției VHB la vârsta adultă nu este însoțită de toleranță imunologică și se cronicizează în sub 10% din cazuri. Epidemiologia, ca și clinica hepatitei B, s-a complicat odată cu investigațiile care compară proprietățile diferitelor genotipuri virale. Există 8 genotipuri VHB cu prevalență geografică distinctă. Între genotipuri există diferențe genomice de peste 8%. În Europa predomină genotipurile A și D. Genotipul D este prevalent în zona mediteraneană iar, mai recent, genotipul D a fost izolat în Franța. Există și genotipuri hibride. Un studiu european recent a găsit că genotipul A răspunde mai bine la interferon, chiar în cazul pacienților cu încărcare virală sau cu transaminaze înalte.

Semnificația epidemiologică a unor forme clinice

Hepatita ocultă este definită ca prezența ADN/VHB în ser sau ficat la bolnavii fără AgHBs. Cum pragul de detecție al kiturilor pentru ADN/VHB variază mult, se consideră că în hepatita ocultă încărcarea virală nu depășește 10^4 copii/ml. Frecvența hepatitei oculte la bolnavi cu constelații serologice diferite este indicată în tabelul 27.VI.

TABELUL 27.VI

FRECVENȚA HEPATITEI OCULTE LA BOLNAVI CU CONSTELAȚII SEROLOGICE DIFERITE

Serologie	Frecvență	Observații
Anti-HBs(-), anti-HBc(+)	30-35%	Mai mare la cei cu HB cronică
Anti-HBs(+), anti-HBc(+)	7-13%	Posibilă, la donatorii de sânge

Hepatita B ocultă reprezintă o sursă de infecție în cazul transfuziilor sau transplantului. În plus, hepatita ocultă poate facilita infecția la imunosupresați sau la bolnavii cu AIDS. Răspunsul la interferon în cazul celor coinfecțați B și C este alterat.

Hepatita B cronică AgHBe negativă (HBe negativ) este datorată infecției cu mutante precore sau core promoter. Cel mai frecvent, o mutație la nivelul codonului 1896 (G → A) creează un codon stop, care abolește situl de clivare al proteinei core și formarea AgHBe.

Prevalența HB cronică negativă este mai mare în zona mediteraneană (33%) decât în zona asiatică (15%) sau în S.U.A. (14%). Toți autorii estimează că această prevalență va crește și, consecutiv, semnificația sa clinică. Pacienții cu HB cronică negativă au un curs fluctuant al simptomatologiei, niveluri înalte sau/și fluctuante ale transaminazelor dar încărcări virale relativ scăzute.

PROFILAXIE

Profilaxia hepatitei B (HB) beneficiază de trei strategii:

- modificări comportamentale,
- imunoprofilaxia pasivă (administrarea de Ig specifice anti-HB),
- vaccinarea anti-HB.

Modificările comportamentale trebuie să vizeze atât populația țintă, cât și personalul medical (inclusiv medicii). Recomandările emise nu trebuie rezumate la cele vizând transmiterea sexuală, ci să insiste pe screeningul mamelor infectate, precum și pe practicile corecte de efectuare a intervențiilor parenterale, depozitarea și îndepărtarea materialelor contaminate, utilizarea dezinfectantelor și a aparaturii de sterilizare. De asemenea, reținerea în prescriere a intervențiilor și tratamentelor invazive trebuie reconsiderată. Educarea tineretului și a celor din grupele marginalizate sau defavorizate sunt esențiale pentru controlul pandemiei HB.

Imunoprofilaxia pasivă este utilizată în patru situații:

- la nou-născuții de la mame infectate,
- în caz de expunere la obiecte contaminate,
- în caz de contacte cu parteneri sexuali infectați,
- în transplantul hepatic.

Imunoglobulinele specifice HB (HBIG) se prepară din sângele donatorilor selectați cu titruri înalte anti-HBs. Dozele recomandate sunt:

- la nou-născuți - 0,13 ml/kg HBIG;
- la adulți, 200-400 UI HBIG, repetat lunar de 3 ori;
- în transplant HBIG asociat cu antivirale.

Vaccinarea antihepatită B se face în România nou-născuților în trei doze administrate în lunile 0-2-6 de la naștere. O a patra doză

este recomandată de unii autori după 2 ani, însă Grupul European Consens asupra hepatitei B nu subscrie acestei recomandări la imunocompetenți. Titrul protector de 10 UI anti-HBs nu reflectă fidel susceptibilitatea subiecților la infecție. Mulți copii care nu prezervă acest titru rămân rezistenți, dar o proporție de 10-20% dintre vaccinați sunt nonresponderi și nu beneficiază de vaccinare.

Schema complicată de imunizare anti-HB determină multe eșecuri sau sustrageri de la vaccinare. Studiile în vederea ameliorării vaccinului actual continuă pentru obținerea unui imunogen după o singură doză sau a unui administrabil pe căi naturale.

Hepatita cronică cu virusul HB

Evoluția hepatitei B depinde de imunocompetența gazdei, de vârsta la care survine infecția și de genotipul viral. În mare măsură acești trei factori ai relației virus-gazdă determină cele trei stadii ale infecției: de toleranță timpurie, de neutralizare imunologică a replicării virale și, în final, de purtător cu sau fără reactivări intermitente.

După infecția acută, între 20-40% dintre adulții imunocompetenți păstrează markerii replicării virale AgHBs sau/și ADN/VHB, în ciuda absenței simptomatologiei. Acest interval în care simptomatologia, markerii biochimici și activitatea histologică sunt minime sau absente este cunoscut ca fază de imunotoleranță. La copii și adolescenți dar mai ales în cazul infecției perinatale, această fază poate dura ani. Din punct de vedere epidemiologic este important de reținut contagiozitatea mare a pacienților în faza de toleranță. Pierderea efectului tolerogen precipită liza imun-indusă a hepatocitelor infectate, care se obiectivează prin creșterea transaminazelor, scăderea ADN/VHB și semne clinice de hepatită. Este stadiul de clearance imun care poate dura luni de zile.

Ultimul stadiu de purtător se caracterizează la cei mai mulți pacienți prin nivele minime sau nedetectabile ale replicării virale (ADN/VHB), seroconversia AgHBe la anti-HBe, normalizarea transaminazelor. Rezoluția spontană cu seroconversia AgHBs la anti-HBs este regula. O proporție diferită de pacienți, în funcție de vârsta infecției, de rasă, de patologia asociată, pot avea reactivări ale markerilor biochimici și serologici, creșterea activității histologice și a încărcării virale. Acesta este tabloul hepatitei cronice agresive cu sau fără seroreversia AgHBe.

AgHBs se decelează în săptămânile 4-6 postinfecție. În acest interval viremia atinge valori uriașe: 10^9 - 10^{10} copii ADN/VHB/ml, în 0,1-0,5% din cazuri survenind hepatite fulminante. Interesant, viremia nu se asociază cu transaminaze crescute. Numai după generarea limfocitelor T citotoxice specifice infecției VHB acești efectori imuni determină citoliză și creșteri enzimatică. Persistența markerilor replicării virale peste 6 luni implică progresia către hepatita cronică.

Vârsta la care survine infecția este invers corelată cu probabilitatea cronicizării. Cronicizarea atinge 70-90% în cazul infecției perinatale. De reținut însă că simptomatologia clinică și biochimică a hepatitei cronice apare la cei infectați timpuriu după lungi intervale (2-3 decade) de relativă inactivitate histologică și replicativă. Un eveniment cheie în clearance-ul viral este seroconversia AgHBe → anti-HBe. Rata seroconversiei spontane este de 8-15% per an. Această rată este mai redusă (2-5%) la cei cu enzime normale. Per ansamblu, la 5 ani de la infecție, 50% fac seroconversie.

O proporție din ce în ce mai mare din pacienții care fac seroconversie rămân cu nivele ridicate de ADN/VHB și fac intermitent recurențe ale markerilor biochimici. Acest tablou este caracteristic apariției mutantelor în regiunea precore sau a promotorului genei precore. Sediul mutațiilor este indicat în tabelul 27.VII.

TABELUL 27.VII

CELE MAI FRECVENTE MUTAȚII ÎN GENA CORE VHB

Secvența genomică	Codonul	Comentariu
Precore	G1896A	Creează codon stop; abolește sinteza AgHBe
Promoter/Precore	1762 și 1764	Mutante selectate de seroconversia AgHBe → anti-HBe

La acești pacienți s-a descris hepatita cronică AgHBe negativă. Există două modalități evolutive în acest caz:

- 30-40% au transaminaze permanent crescute (de 3-4 ori normalul);

- 60-70% au perioade intermitente cu transaminaze crescute.

Numai 6-15% din bolnavii cu hepatită cronică AgHBe negativă înregistrează remisiuni spontane definitive (rata anuală 0,5%). Prognosticul în hepatitele cronice AgHBe negative este mai rezervat decât în hepatitele cronice AgHBe pozitive atât în ceea ce privește probabilitatea cirozei, cât și a CHP.

Prognosticul purtătorilor cronici de ADN/VHB cu sau fără AgHBs, dar cu anti-HBe este favorabil. Rata anuală a clearance-ului AgHBs este de 2% în Europa de Vest, dar numai de 0,05% în Asia și în alte regiuni endemice. Reactivarea hepatitei cronice poate surveni la 20-50% dintre pacienții supuși terapiei imunosupresive cu citostatice, mai ales în cazul asocierii cu steroizi. Aceste reactivări conduc frecvent la decompensări hepatice. Un tablou mai rar întâlnit se înregistrează în coinfecția HIV/HBV la pacienții care beneficiază de anti-retrovirale. Aici, restaurarea imunologică poate determina pusee de hepatită care, uneori, sunt greșit interpretate ca reacții adverse ale medicației.

Incidența cumulativă la 5 ani a cirozei la pacienții cu hepatită cronică netratată este de 8-20%. Vârsta înaintată, încărcarea virală înaltă, ca și apariția mutantelor AgHBe negative cresc riscul cirogen. Alți factori care promovează ciroza sunt: alcoolismul, coinfecția VHC și genotipul C.

Decompensarea cirozei survine după mai mult de 30 de luni de evoluție, cu o rată de 16% la 5 ani. După primul episod de decompensare prognosticul se agravează sensibil, supraviețuirea fiind de numai 14-28% la 5 ani.

O altă cauză de mortalitate în hepatita B cronică este CHP. Incidența cancerului este de 3-6 ori mai mare la bărbați, sugerând rolul carcinogen al androgenilor. Probabil că factorii genetici cresc riscul carcinogen, pentru că în Asia incidența este mai mare. Riscul este de 10 ori mai mare la cei cu AgHBs persistent și de 60 de ori mai mare la cei cu AgHBe. Spre deosebire de hepatita C, apariția cancerului la cei infectați cu VHB nu depinde de stadiul cirogen. Riscul este real chiar la cei fără ciroză, iar screeningul lor periodic pentru alfafetoproteină sau prin ecografie se impune. Există puține date asupra rolului carcinogen al anumitor genotipuri sau mutante virale, iar afirmațiile potrivit cărora vaccinarea ar putea selecta mutante carcinogene sunt premature.

Carcinomul hepatocelular este de 100 de ori mai frecvent la subiecții care au făcut infecția HBV decât la cei neinfecțați. De exemplu, riscul relativ al dezvoltării CHP este de 60 la 2 la cei cu AgHBs și AgHBe, față de cei cu AgHBs singur. Eforturile terapeutice de a reduce nivelul ADN/VHB au ca scop și scăderea riscului CHP. Genotipul VHB cel mai frecvent asociat cu dezvoltarea CHP (și/sau a cirozei) este genotipul C.

TRATAMENTUL CU ANTIVIRALE

Tratamentul hepatitei B cronice beneficiază de mai multe medicamente (tabelul 27.VIII) aprobate FDA (*Food and Drug Administration* - autoritatea americană) și/sau EMEA (Agenția Europeană a Medicamentului). Alături de cele două forme de interferon (interferon alfa 2b și Pegasys - IFN pegylat), cele mai folosite sunt lamivudina (LAM) și adefovirul (ADF). Interferonul este imunomodulator și are efect antiviral direct și indirect. Durata tratamentului este de cel puțin 24 de săptămâni. Prelungirea poate ameliora rata de răspuns. Rezultatele sunt durabile, dar 10-15% fac reacții după un an. Rata de răspuns este mai joasă la asiatici. LAM este un antiretroviral preluat din medicația anti-HIV. Este un medicament ieftin și eficient.

TABELUL 27.VIII

ANTIRETROVIRALE ÎN TRATAMENTUL HEPATITEI B

Clasa de substanțe	Medicamentul	Mutații asociate rezistenței	Rata pacienților cu rezistență la 1 an
L-nucleozizi	Lamivudine	M 204 V/I	15-30%
	Emtricitabine		
	Telbivudine		
	Clevudine		
Compuși aciclici fosforați	Adefovir	N 236 T; A 181 V/T	3%-11% la 2-3 ani
	Tenofovir		
Compuși cu inel ciclopentan/penten	Entecavir	substituții la pozițiile 184, 202, și 250 ale RT	0% la 2 ani
	Abacavir		

Scopul principal al tratamentului în hepatita cronică B este prevenirea distrugerii progresive a hepatocitelor. O serie de noi analogi nucleozidici s-au dovedit inhibitori mai activi ai replicării virale decât tratamentul clasic cu interferon. Între aceștia, alături de **lamivudină** (didezoxicitidină), care rămâne preparatul de elecție, au apărut: famciclovirul, lobucavirul și adefovirul. Lamivudina scade la aproximativ 80% din bolnavi încărcarea virală în hepatita B cronică de peste 100 de ori. Întreruperea tratamentului este însă însoțită de reluarea replicării virale, pentru că medicamentul nu influențează ADN viral suprahelicoidal integrat în genomul hepatocitar. Doza de lamivudină este minimă: 100 mg zilnic.

Alte antivirale creditate cu activitate anti-VHB:

- **Famciclovir:** analog de guanozină, a fost utilizat posttransplant hepatic; induce rezistență încrucișată cu mutantele insensibile la lamivudină.

- **Lobucavir:** este tot analog de guanozină, care ar inhiba și replicarea ADN viral suprahelicoidal însă cu prețul unei toxicități accentuate.

- **Adefovir** este un prodrug al adeninei, care rămâne activ pe mutantele rezistente la lamivudină.

LAM produce o scădere semnificativă a încărcării virale dar, administrată singură (monoterapie), induce rapid mutante rezistente. Mai mult, selecția mutantelor rezistente la LAM favorizează apariția rezistenței și la alte medicamente, pentru că procesul este gradual și depinde de acumularea treptată a mutațiilor care contribuie la bariera genetică a rezistenței. Monoterapia ar trebui înlocuită cu administrarea simultană a mai multor medicamente pentru care nu există date de rezistență încrucișată. Monitorizarea apariției mutantelor rezistente se face prin tehnici virusologice sofisticate de detecție a vari-

antelor minore care conțin mutațiile ce condiționează rezistența. O astfel de tehnică, numită *Phenoscript HBV*, amplifică gena pol și determină creșterea concentrației inhibitorii (IC_{50}) în raport cu virusul sălbatic.

Sinteză (virusul hepatitei B)

Hepadnavirus (genom ADN parțial ds, parțial circular); două feluri de virioni: 22 nm și 42 nm (genom mic ~3,2 kb), simetrie cubică, anvelopat,

Virus **extrem de rezistent** la căldură și la dezinfectante. Virus exclusiv al omului, prezintă 8 genotipuri (A-H); replicare cu revers-transcriere, generatoare de mutante în genele S, P, C și X.

Hepatita B: transmitere parenterală, sexuală și materno-fetală.

Incubație medie 75 de zile, forme anicterice în 60% cazuri la copil, forme fulminante 0,1%, vindecare cu cronicizare, mai ales în cazul infecției materno-fetale (90%) sau la copiii preșcolari (40%).

Diagnostic: evidențierea AgHBs; AgHBe ADN/VHB (toți markeri de replicare activă), anticorpi anti-HBc de tip IgM (ELISA) (marker serologic de infecție recentă). Diagnostic molecular pentru determinarea încărcării virale (copii ADN/VHB) și a mutantelor.

Profilaxie specifică: vaccin inactivat conținând numai AgHBs obținut prin biotehnologie.

BIBLIOGRAFIE

- MacCallum FO. Identificarea hepatitei B, cu transmitere parenterală. *Lancet* 1947;2:691-692.
- Blumberg B et al. Descoperirea antigenului Australia AgHBs. *Ann. Intern. Med.* 1967;66:924-931 (premiul Nobel 1976).
- Dane et al. Vizualizarea virionului complet. *Lancet* 1970;i:695-698.
- Valenzuela et al. Producția vaccinului recombinant în *S. Cerevisiae*. *Nature* 1982;298:347-351.
- Chang et al. Rolul vaccinării în profilaxia hepatocarcinomului. *NEJM* 1997;336:1855-1859.

ADENOVIRIDAE

De reținut:

Virioni neanvelopați, cu simetrie icosaedrică, 65-80 nm în diametru. Capsida conține 252 capsomere (240 hexoni și 12 pentoni) și proiecții externe cu baza pe pentoni, numite fibre. Genomul ADNds a fost cartografiat pentru multe serotipuri și a servit ca model experimental pentru studiul in vitro al replicării ADN la eukariote.

Caractere importante: adenovirusurile au fost primele virusuri implicate în carcinogeneza experimentală la animal. Expresia unor antigene de histocompatibilitate este controlată de genele virale în cursul infecției persistente. Infecțiile acute, citocide, se manifestă clinic ca infecții respiratorii, digestive, conjunctivale, adenoidiene etc.

Istoric. Adenovirusurile au fost descoperite accidental în perioada de extindere a utilizării culturilor de celule în diagnosticul virusologic. Culturi de celule inițiate din biopsii recoltate la amigdalectomii evidențiau "spontan" un efect citopatic caracteristic: celule degenerate cu nucleii hipertrofiați conținând incluzii bazofile sau amfofile. Celulele epiteliale sunt ținta preferențială a replicării adenovirusurilor in vitro și in vivo.

Interesul pentru adenovirusuri a crescut în anii '60, când s-a demonstrat oncogenitatea unor serotipuri pentru hamsterul nou-născut și, ulterior, capacitatea transformantă in vitro pentru culturi de rozătoare. Adenovirusurile reprezintă un model preferențial în studiile de biologie moleculară, existând rezultate interesante care leagă expresia unor gene virale de aspecte clinice specifice. De exemplu: sinteza pentonilor este legată de toxicitatea unor serotipuri (singurele toxine produse în infecțiile virale), iar sinteza unor polipeptide timpurii (E1A) are efect asupra ciclului celular și imunomodulator.

CLASIFICARE

Cele 48 de serotipuri umane cunoscute sunt clasificate în raport cu criterii mai vechi sau mai noi în câteva subgrupuri. Criteriile uti-

lizate sunt hemaglutinarea (cu hematii de maimuță sau șobolan), oncogenitatea la hamster și similitudinile genomice în secvența nucleotidică a ADN viral. Indiferent de criterii, serotipurile se grupează neașteptat de asemănător, rezultând patru subgrupe cu foarte puține serotipuri neclasificabile. Noile adenovirusuri noncultivabile izolate din fecale reprezintă probabil un nou subgrup.

TABELUL 28.I

BOLI ASOCIATE ADENOVIROZELOR

<i>Boala</i>	<i>Prevalența la:</i>	<i>Serotipuri implicate</i>
Faringita acută	sugari, copii	1,2,3,5,6,7
Farigoconjunctivita febrilă	școlari	3,7,14
Pneumonii	sugari, copii, recruți	14,21
Keratoconjunctivite epidemice	toate vârstele	8,11,19,37
Sindrom Pertussis-like	sugari	5
Gastroenterite acute	sugari, copii	40,41
Cistite	sugari, copii	11,21
Hepatite	copii, transplant ficat	1,2,5

În ceea ce privește coincidența apartenenței la un subgrup taxonomic cu un anumit spectru clinic lucrurile sunt mai puțin simple. Datele rezumate în tabelul 28.I fac abstracție de frecvența infecțiilor subclinice cu adenovirusuri, de asocierea lor cu episoade epidemice sau sporadice precum și de clinica infecțiilor experimentale.

PROPRIETĂȚI STRUCTURALE ȘI FUNCȚIONALE ALE VIRIONULUI

Adenovirusurile au genom ADNds, sunt lipsite de anvelopă și prezintă o simetrie icosaedrică a capsidei. Capsida conține 252 capsomere: 12 pentoni situați la joncțiunea a 5 fețe triunghiulare și 240 hexoni situați pe fețele triunghiulare. Pentonii servesc ca bază pentru implantarea unor proiecții externe alcătuite dintr-o tijă fibrilară și un capăt măciucat. Complexul penton și fibră este numit capsomerul pentonic.

Toate adenovirusurile umane au un antigen de grup comun care este cantonat pe hexoni. Pe fibra pentonului a fost localizat un antigen specific de tip implicat și în proprietățile hemaglutinante ale adenovirusurilor și în inducția anticorpilor virus-neutralizanți. Peptidului din structura bazei pentonului îi sunt atribuite proprietăți toxice și de citopatogenitate.

Un alt antigen discutat (*T-penton tumor antigen*) este recunoscut de anticorpii prezenți la animale purtătoare de tumori induse de adenovirusuri. Acest antigen nu este înrudit cu peptidele structurale din hexoni, pentoni sau fibre, ci cu proteine timpurii (codificate de genele E1A și E1B, E pentru "early") sintetizate în ciclul replicativ adenoviral.

CLINICĂ

Inițial, adenovirusurile au fost asociate infecțiilor respiratorii acute, dar extinderea diagnosticului virusologic a demonstrat implicarea lor în afecțiuni sporadice sau epidemice vizând tractul digestiv, urinar, ganglionii limfatici, ochiul etc. Adenovirusurile ilustrează perfect afirmația că, de obicei, un virus nu determină numai un anumit fel de patologie, iar aceeași simptomatologie poate recunoaște o etiologie virală diversă. Enumerăm afecțiunile cele mai frecvent determinate de adenovirusuri:

1. Faringita epidemică sau endemică întâlnită la copii și care este determinată de serotipurile 1, 2, 3, 5, 7. Este o afecțiune febrilă, uneori complicată de keratoconjunctivită, pneumonie și crup. Incubația este de 5-7 zile, evoluția autolimitantă este, de asemenea, scurtă.

2. Infecții acute ale căilor respiratorii superioare survin epidemic în colectivități (de școlari, de militari etc.), ceea ce a determinat interesul pentru un vaccin viu administrat per os în capsule enterice. Serotipurile implicate sunt 4, 7, 14, 21.

3. Keratoconjunctivita epidemică sau "de bazin" este determinată de tipul 8 și, rareori, de tipul 19. Incubația este în medie 10 zile (între 5-20), iar debutul implică fotofobie, senzație de corp străin în ochi, lăcrimare, adenopatie preauriculară etc. Eroziuni punctiforme corneene cu vedere tulbure se întâlnesc la copii. Transmiterea iatrogenă prin instrumentarul oftalmologic a keratoconjunctivitei adenovirale nu este exclusă.

4. Cistita hemoragică acută este o afecțiune sporadică întâlnită la copii. Serotipul 11 este frecvent izolat.

5. Adenita mezenterică și apendicita acută reprezintă urmarea tropismului adenoidian al unor serotipuri (1, 5). Inflamarea ganglionilor mezenterici și a țesutului limfoid din plăcile Peyer poate determina invaginare, tulburări de peristaltism și simptomatologie de abdomen acut la copiii mici.

6. Sindromul asemănător tusei convulsive (Pertussis-like). O serie de autori au comunicat frecvența izolării mixte de adenovirusuri și *Bacillus pertussis* de la copii cu tuse convulsivă. Posibilitatea activării unui adenovirus latent de către *B. pertussis* este o explicație tot atât de plauzibilă ca și creșterea susceptibilității la infecția adenovirală secundar infecției bacteriene.

7. Gastroenterite adenovirale au fost diagnosticate la copii mici sau la adulți imunosupresați. Este discutabil dacă adenovirusurile izolate din fecale constituie etiologia sindromului diareic, pentru că aceleași adenovirusuri se izolează din scaun și de la subiecții sănătoși. Serotipuri mai recente, năncultivabile, dar evidențiate prin imunoelectronicmicroscopie par să se grupeze într-un subgrup cu tropism enteric.

Latența este o proprietate comună adenovirusurilor care explică recrudescențele apărute la purtători. La fel interpretăm asocierea acestor virusuri cu afecțiunile cele mai diverse: hepatite, meningite, encefalite etc. În general, anticorpii antiadenovirali ating o seroprevalență de 70-80% la vârsta de 9-10 ani, dar mai puțin de 50% din subiecți fac infecții simptomatice.

ONCOGENITATE

Serotipurile 12, 18, 31 au potențial oncogen înalt la hamster și șobolan nou-născut și capacitate transformantă in vitro, pe culturi de la aceleași specii. Alte serotipuri umane sunt oncogene în mai mică măsură. Histologic, tumorile sunt de tip sarcomatos. Studii serologice sau de hibridare moleculară la bolnavi cu neoplasme diferite nu au argumentat participarea adenovirusurilor în cancerul uman.

Regiunea genomului adenoviral implicată în sinteza proteinelor timpurii (mai ales cea desemnată E1 "*immediate early*") este critică pentru transformarea cu adenovirusuri. Domeniul E1A este necesar pentru imortalizarea celulelor în cultură, iar E1B pentru transformare. Două etape sunt parcurse de celulele normale în cursul transformării:

- prima poate fi substituită de hiperexpresia protooncogenei celulare *Ha-ras*;

- a doua este similară funcției oncogenei celulare *myc* (capitolul 27).

Recent, o altă funcție a proteinei adenovirale E1A a fost elucidată: inactivarea unei antioncogene celulare: Rb (pentru retinoblastom). Antigenul T mare al virusului SV40 și antigenul E7 al papillomavirusului 16 cuplează, de asemenea, proteina codificată de antioncogenul Rb. Se sugerează, astfel, un mecanism comun de oncogeneză pentru trei dezoxiribovirusuri diferite.

DEFECTIVITATE

Un virus defectiv într-un anumit sistem virus - gazdă se replică numai în coinfecție cu sau complementat de un virus helper. Adenovirusurile asistă replicarea unor dependovirusuri (familia par-

voviridae) în culturi de hamster unde potențialul lor oncogen este astfel limitat. La rândul lor, unele adenovirusuri se replică productiv în celule simiene numai dacă acestea sunt infectate latent cu virusul SV40 (familia papovaviridae). Relevanța unor virioni hibrizi în care capsida adenovirală îmbracă genomul SV40 pentru oncogenitate și pentru securitatea unor vaccinuri (preparate pe substrat simian) este neclară.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

În funcție de prezentarea clinică probele recoltate pentru izolare sunt spălături nazofaringiene, fecale, secreții conjunctivale, țesut adenoidian. Izolarea în culturi de fibroblaste de embrion uman este facilă, pentru că adenovirusurile sunt dintre cele mai rezistente virusuri la căldură, dezinfectante etc. Efectul citopatic este o primă indicație diagnostică. Confirmarea se face prin fixare de complement, reacție care decelează antigene comune mai multor serotipuri.

Imunofluorescența și imuno-electronmicroscopia sunt tehnici utilizate pentru evidențierea adenovirusurilor noncultivabile. Criteriile folosite pentru tipizare vizează succesiv: (1) evidențierea antigenelor fixatoare de complement (comune pentru subgrupuri), (2) evidențierea particularităților hemaglutinării și, în final, (3) reacțiile de seroneutralizare. Corespondența acestor date cu alte particularități biologice ale adenovirusurilor sunt sumarizate în tabelul 28.II.

TABELUL 28.II

SCHEMA DE CLASIFICARE A ADENOVIRUSURILOR UMANE

Subgrup	*Hemaglutinare	Serotipuri	Oncogenitate	%G+C/ADN
A	absentă	12,18,31	+++	48-49
B	mămuță	3,7,11,14,16,21,34,35	+	50-52
C	șobolan +/-	1,2,5,6	-	57-59
D	șobolan +++	8,9,19,37 etc	-	57-61
E	șobolan +/-	4,40,41	-	57-59
F	șobolan +/-	46,47,48	-	57-59

*Specia de hematii și intensitatea hemaglutinării.

PROFILAXIE

Numărul serotipurilor adenovirale reflectă nu numai ordinea descoperirii lor, ci, implicit, frecvența asocierii lor cu o patologie dis-

tinctă. Este deci explicabil că vaccinurile antiadenovirale produse au inclus cel mai frecvent antigenele primelor serotipuri. Afecțiunile respiratorii adenovirale la copii sau în colectivități militare au fost ținta aplicării unor vaccinuri polivalente vii atenuate (serotipurile 4, 7) sau inactivate.

Protecția rezultată este de 50-70%, iar rezultatele evaluării cost/beneficiu indică și avantaje economice.

ADENOVIRUSURI ONCOLITICE

Interesul pentru studiul adenovirusurilor a sporit în ultimii ani ca urmare a folosirii lor drept vector pentru **terapia genică** a unor deficiențe înnăscute enzimactice. Gene umane care codifică enzime ce lipsesc unor copii pot fi introduse prin adenovirusuri modificate genetic.

O contribuție importantă a lui Levaditi și Nicolau a fost ipoteza activității oncolitice a virusurilor. Virusurile sunt o sabie cu două tăișuri: ele pot provoca sau liza cancerele. Afirmția celor doi autori că tumorile funcționează ca un burete pentru virusuri a fost ulterior amplu confirmată. Acest fenomen a sugerat ideea unei posibile bioterapii în cancer (Levaditi C., Nicolau S. *Virus et tumeurs*. Ann Inst Pasteur 1923;37:1-3). Oncoliza virală este reluată în prezent prin utilizarea vectorilor virali (mai ales, adenovirali) în terapia genică a cancerului (tabelele 28.III și 28.IV).

TABELUL 28.III

CINCI MECANISME PENTRU REALIZAREA REPLICĂRII TUMORAL-SELECTIVE

Mecanism	Virusuri/Familii virale
Virusuri natural selective	VSV, NDV*
Virusuri cu genom deletat parțial	HSV, adeno, vaccina
Virusuri care depind de expresia unor gene tumorale celulare	adeno, polio
Virusuri sub controlul unor promotori celulari	adeno, HSV
Virusuri cu capsida modificată spre a lega receptori tumorali	adeno, polio

*VSV - virusul stomatitei veziculare (rhabdovirus); NDV - virusul bolii NewCastle (paramixo).

Adenovirusurile induc moarte celulară prin liza celulelor în care se replică. Această capacitate citotoxică poate fi focalizată numai asupra celulelor canceroase prin deleția structurilor care leagă receptorul natural și redirecționarea adsorbției către proteine exprimate de celulele canceroase. În plus, au fost selecționate mutante virale care se replică numai în celulele tumorale care au alterată expresia unor antioncogene. Astfel, mutante adenovirale cu genele timpurii deletate

se replică în celulele tumorale care exprimă antioncoproteina pRB - retinoblastom (cuplată de proteina virală E1A) - sau p53 (cuplată de E1B). Interacțiunea pRb+E1A forțează celula tumorală să intre în faza S a ciclului celular și promovează apoptoza. Această secvență de evenimente a inspirat crearea unor mutante adenovirale competente replicativ care sunt folosite ca agenți oncolitici. Primul adeno-virus oncolitic a început să fie aplicat pe scară largă în China, din 2005, pentru tratamentul carcinomului nazofaringian. Adenovirusurile oncolitice sunt folosite experimental și în tratamentul unor gliome sau unor tumori hepatice. Efectul este sinergic în cazul administrării simultane de citostatice.

TABELUL 28.IV

CALITĂȚI IDEALE ALE UNUI VIRUS ONCOLITIC SELECTIV

Infectează, se replică și lizează celulele tumorale Nu se replică în celule normale esențiale pentru organism Determină cel mult simptomatologie limitată Există medicamente antivirale specifice eficiente Este stabil genetic Nu se integrează în genomul celular Poate fi produs în concentrații mari după protocoale GMP recunoscute

Sinteză

Adenovirusurile umane au virionul icosaedric cu diametrul de 80 nm, neanvelopat, cu o capsidă cu 256 capsomere de diferite forme: pentoni, hexoni, fibre. Fibrele asemănătoare unor antene măciucate erup la 10-50 nm în afara virionului.

Genomul ADNds linear, alcătuit dintr-un unic segment. Dimensiunea: 36 kb cu 40-45 cadre de citire. În genom au fost descrise regiuni pentru sinteza proteinelor timpurii și tardive (structurale). Traducerea informației la adenovirusuri a dus la descoperirea fenomenului de îmbinare ARN (*splicing RNA* - premiul Nobel).

Replicare: internalizarea este mediată de receptorul CAR (Receptorul Cox-Adeno) și se face prin endocitoză. Alți receptori care participă la penetrare sunt integrinele $\alpha\beta 3$ și $\alpha\beta 5$. Transcriptaza: ARN polimeraza II a gazdei. Replicaza - ADN polimeraza virală în infecția productivă. Sediul replicării este în nucleu. Eliberarea din celulă este datorată rupturii membranei nucleare determinată de proteina letală adenovirală (*adenovirus death protein* - ADP). Progenii se acumulează în mari cantități în nucleu.

Boli asociate: infecții adenovirale endemice la copii. Adenofarigoconjunctivite epidemice. Infecții ale căilor respiratorii superioare. Boli venerice Ad 37. Boli diareice Ad 40, Ad 41. Neuroinfecții Ad 3, Ad 7, Ad 21. Imunodeficiențe primitive Ad 31.

Boli asociate transplantului: cardiomiopatii Ad 2. Ocluzii la copii.

BIBLIOGRAFIE

- Rowe WP et al. Prima izolare a unui adenovirus uman. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953;84:570-573.
- Trentin JJ et al. Demonstrarea oncogenității adeno 12 la șoarece nou-născut. Science 1962;137:835-847.
- Bergelson JM et al. Detecția mecanismului de splicing 1993 - Receptorul CAR. Science 1997;275:1320-1323.
- Hong Jiang et al. Prima aplicare la om a oncoterapiei virale. Expert Rev. Anticancer Therapy 2006;6:697-708.

PAPOVAVIRIDAE

De reținut:

Virioni mici, neanvelopați, cu răspândire la mamifere, unde au specificitate restrânsă pentru o anumită specie gazdă. Genomul este ADNds, circular, cu replicare în nucleii celulei gazdă.

Caractere importante: papillomavirusurile au tropism specific pentru celulele epiteliale scuamoase. Au fost descrise în jur de 100 de genotipuri, unele cu potențial malign pronunțat in vivo (16, 18, 31, 33) și transformant in vitro. Polyomavirusurile infectează un spectru mai larg de gazde, dar nu provoacă cancer la gazda naturală. Două virusuri (BK și JC), asemănătoare SV40 au fost izolate de la om în condiții de imunosupresie avansată.

Istoric. Numele Papova a fost format prin alăturarea primelor silabe din denumirile următorilor agenți: virusurile *papilloma* (la om și iepure), virusul *polyoma* (la șoarece) și virusul simian vacuolizant SV40. Primul papillomavirus a fost izolat de Richard Shope de la iepuri cu papilomatoză cutanată. Inexistența unor sisteme de cultivare in vitro a acestor virusuri a întârziat acumularea cunoștințelor asupra diversității lor. După 1970, când analiza genomică a devenit posibilă prin teste de hibridizare, varietatea tipologică a papillomavirusurilor și participarea unora dintre ele la etiologia cancerelor de col uterin a stimulat interesul pentru acest grup.

Primul polyomavirus a fost izolat de Ludwik Gross în 1953 și numit astfel datorită capacității de a induce tumori cu localizări multiple. Virusul SV40 a fost izolat de Hilleman și Sweet din vaccinul polio contaminat (capitolul 10).

PROPRIETĂȚI MORFOLOGICE ȘI DE CULTIVARE

Papillomavirusurile au fost propagate cu mare dificultate în culturi epiteliale umane. Nucleii celulelor infectate prezintă incluzii

bazofile, iar potențialul lor de creștere este amplificat asemănător celulelor transformate.

Proteinele capsidare ale virusului sunt sintetizate în citoplasmă, apoi transferate în nucleu, unde assemblează minicromozomul viral (genomul) într-o particulă sferică, diferită de regulile simetriei icosaedrice. Studii recente au stabilit că cele 72 de capsomere sunt identice (pentameri) și nu se pliază regulilor de simetrie care prognozează existența a 12 pentameri și a 60 de hexameri. Autoasamblarea este dictată de structura proteică tridimensională care permite interacțiuni adaptabile între componente.

Polyomavirusurile pot cultiva în celule gliale fetale sau de amnios uman. Celulele de la alte specii (hamster) sunt frecvent transformate; celulele transformate nu produc virus. Hibridarea ADN arată asemănarea dintre secvențele genomice SV40 și BK. Papovavirusurile sunt virusuri cu genom ADNds de dimensiuni reduse (<10 kb). Familia include:

- virusurile papilloma (peste 100 genotipuri la om) (fig. 29.1),
- virusul polyoma (virus al rozătoarelor), virusul simian vacuolizant (SV40).

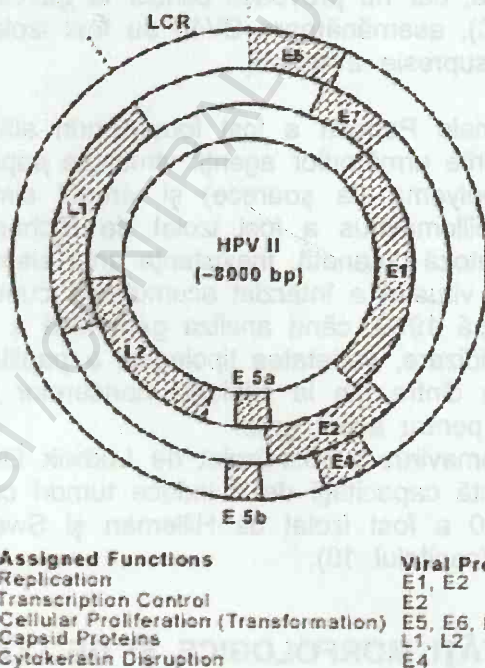


Fig. 29.1. Genomul papillomavirusului uman 11 de aproximativ 8 000 perechi baze (bp) codifică cel puțin 9 proteine a căror funcție este fie în replicarea virală (E1, E2, L1, L2 etc.), fie în transformarea celulară (E5, E6, E7).

Papovavirusurile pot interacționa cu celulele gazdă în două moduri:

- infecție litică în celule permissive cu producția de virioni infectanți,
- infecție persistentă în celule nepermissive care duce la transformare malignă.

Speciile de papillomavirusuri au tropism strict pentru specia gazdă parazitată. Toate au tropism pentru celulele epiteliale. Infecția debutează la nivelul celulelor bazale dermice. La acest nivel se detectează numai proteinele timpurii. Proteinele tardive și asamblarea virionilor maturi, infectanți, însoțesc diferențierea (keratinizarea) celulelor dermice superficiale. Există deci o relație strânsă între diferențierea celulară și progresia replicării virale.

Genele virale responsabile de transformare nu au corespondent celular, ele sunt necesare și replicării virale. Două proteine timpurii codificate de aceste gene **E6** și **E7** (de la "early") interacționează cu produsele antioncogenelor (*cellular tumor suppressor genes*) și le anihilează. E6 cuplează ubiquitin ligaza celulară și apoi antioncogenul p53, ceea ce conduce la **instabilitate genomică**. E7 este o serinofoproteină care leagă Rb (proteina retinoblastom).

CLINICĂ

Leziunile provocate de papillomavirusuri sunt sintetizate în tabelul 29 I. Ele apar consecutiv replicării la poarta de intrare, ceea ce explică răspunsul primar în anticorpi. Aceștia apar în momentul regresiei leziunilor ca urmare a sensibilizării la antigene eliberate prin distrucția celulelor infectate. Toate leziunile determinate de papillomavirusuri regresează după administrare locală de interferon, dar înțetarea terapiei este însoțită de recidive.

Polyomavirusurile au fost izolate de la bolnavi cu transplant renal (**BK**) supuși terapiei imunosupresoare. Aproximativ 30% din acești bolnavi excretă virusul în urină, dar leziunile ureterale asociate sunt rare. Virusul **JC** a fost izolat din biopsia cerebrală a unui bolnav cu leucoencefalopatie progresivă multifocală (LPM), sindrom de asemenea asociat imunosupresiei.

TABELUL 29.I

ASPECTE CLINICE ALE INFECȚIEI CU PAPILOMAVIRUSURI

Leziunea	Regiunea	Serotipul
Veruca vulgaris	palma/plantă	1,2,4
Condiloma acuminata	genitală	6,11,16,18,31
Papiloame laringiene	orală, corzi vocale	13,32
Epidermodisplazia veruciformă familială	piele	5
Carcinom col uterin	ano-genitală	16,18

Virusul **SV40** a fost inoculat involuntar odată cu primele șarje de vaccin polio provenind din celulele renale de maimuță pe care vaccinul era preparat. În ciuda existenței anticorpilor la donatori, nu s-au raportat condiții clinice asociate infecției omului cu SV40.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Papillomavirusurile pot fi evidențiate prin microscopie electronică sau prin tehnici de hibridizare ADN. Nu există diagnostic serologic, iar izolarea în culturi celulare obișnuite este imposibilă. În schimb, evidențierea anticorpilor anti-JC sau BK poate fi realizată prin hemaglutinoinhibare sau imunofluorescență.

CARCINOGENEZĂ

O caracteristică a genomului tuturor papillomavirusurilor este localizarea genelor transcrise pe o singură spirală ADN. Aceste gene au fost împărțite în timpurii (E) și tardive (L). O parte a genomului timpuriu (60%) este suficientă pentru transformare. Genele L (*late*) se exprimă numai în celule infectate productiv. Controlul expresiei genelor virale este concentrat într-o zonă circumscrișă a genomului numită LCR (*long control region*). LCR conține elemente de "stimulare" (*enhancer*) care pot fi activate de factori celulari sau virali cu o anumită specificitate. Genele implicate în transformare și carcinogeneză sunt gene timpurii activate via factori celulari și LCR. Proteinele codificate de aceste gene - oncoproteine (E5, E6, E7), sunt prea mici pentru a avea funcție enzimatică intrinsecă, însă alterează profund funcții ale membranei celulare implicate în proliferare.

Un argument important pentru implicarea papillomavirusurilor în cancerul uman apărute natural este evidențierea unor secvențe genomice virale în genomul celulelor maligne. În general, progresia leziunilor determinate de papillomavirusuri spre malignizare este foarte lentă, implicând cofactori celulari și virali.

Papillomavirusurile umane (HPV)

Sunt responsabile de 10% din cancerul epitelial la om (genotipurile înalt oncogene sunt: 16, 18, 31). În majoritatea cazurilor papillomavirusurile determină proliferări benigne: negii sau verucile. În afara papillomavirusurilor cu tropism cutanat, un grup numeros prezintă tropism pentru mucoase și se transmit sexual. Acestea din urmă au fost asociate cu cancerul de col uterin, cancerul anal sau vulvar. Diagnosticul se pune prin evidențierea secvențelor de ADN viral prin hibridizare cu sonde specifice sau prin amplificare genică (PCR).

De notat că secvențe **ARN antisens** corespunzătoare genelor E6 și E7 reduc creșterea celulelor canceroase, arătând că HPV participă nu numai la inițierea, dar și la menținerea fenotipului malign.

HPV infectează stratul bazal al dermului prin soluții de continuitate în epiderm. Infecția productivă se produce numai dacă celulele dermului se keratinizează. În cazul lipsei de diferențiere a celulelor dermului, infecția este nonproductivă și conduce la transformarea malignă. În unele familii există o predispoziție genetică (recesivă) care determină formarea unor negi diseminați (*epidermodysplasia verruciformis*) și un risc mare de evoluție malignă (>30%). Tumorile maligne apar mai ales pe pielea expusă la soare sau traumatizată.

Explicația moleculară a oncogenității sporite a unor genotipuri HPV se rezumă astfel:

- proteinele E6/E7 au afinitate mai mare pentru antioncoproteine,
- inhibiția antioncogenelor dereglează ciclul de creștere celular,
- dereglările în ciclul celular conduc la acumularea de mutații (care nu sunt excizate),
- mutațiile vizează mai ales protooncogenele și promovează diviziunea celulară necontrolată.

Cancerul este un proces multistadial în care participarea altor cofactori (alături de infecția virală persistentă) trebuie atent monitorizată. Între cofactori menționăm imunosupresia, alte boli sexual transmise, fumatul etc.

PROFILAXIE

În 2006, în Statele Unite a fost aprobat un quadrivaccin împotriva a 4 dintre cele mai virulente papillomavirusuri HPV 6, 11, 16, 18. Vaccinul Gardasil® este indicat pentru fetele peste 12 ani (sau mai extins între 9-26 de ani) prevenind cancerul vaginal, vulvar și cervical. De asemenea, vaccinul previne leziunile genitale precanceroase la femei, verucile genitale și alte leziuni benigne precum *condyloma acuminata*. Deși nu dispunem de date confirmate în timp, se pare că imunitatea indusă de o schemă completă de imunizare constând din trei doze la intervale de 0, 2 și 6 luni protejează tot restul vieții. Costul vaccinului este deocamdată prohibitiv - 360 \$ trei doze. Gardasil este al doilea vaccin viral destinat prevenirii unor cancere după vaccinul anti-hepatită B.

Polyomavirusuri

Polyomavirusurile infectează un spectru larg de vertebrate (cel puțin 12 specii virale izolate). Gross, în 1953, în timpul studiilor asupra leucemiei la șoarece, a descoperit primul polyomavirus pe care

I-a denumit astfel datorită capacității de a induce multiple tumori solide cu localizări diverse. Un virus din același taxon este virusul vacuolizant simian SV40. Izolatul SV40 a provenit din investigarea șarjelor de vaccin polio oral preparate pe culturi primare de rinichi de maimuță. Această contaminare a vaccinului a trezit îngrijorare, cunoscându-se potențialul oncogen al SV40. Studii extinse ulterioare au infirmat impactul administrării vaccinului polio contaminat cu SV40 asupra incidenței cancerelor umane. Totuși SV40 este incriminat în apariția unor limfoame sau a unor tumori ale SNC.

SV40 este prototipul familiei polyomavirinae. Virionii sunt mici, fără anvelopă, cu simetrie icosaedrică. Genomul are 5 243 bp și codifică proteine structurale (VP1, VP2, VP3) și nonstructurale - antigenele T (mare) și t (mic) etc. Genomul poate fi împărțit în trei domenii: o regiune codantă timpurie, o regiune codantă tardivă și o regiune reglatorie. Aparatul celular de transcriere inițiază replicarea timpurie. SV40 infectează celulele diferențiate, oprite în diviziune. Cele două antigene T și t cooperează impulsionând trecerea celulelor infectate în diviziune (în faza S a mitozei), făcând posibilă sinteza virionilor progeneri. Din activitatea acestor antigene derivă potențialul oncogen al SV40 in vivo la hamster și in vitro prin transformarea celulelor infectate persistent. Celulele transformate sunt imortalizate și au un potențial proliferativ exagerat. Transformarea este modelul in vitro al cancerului in vivo.

Concluzii

Papillomavirusurile sunt implicate în etiologia unor cancere genitale (mai ales de col uterin) și laringiene. Infecții neproductive asociate numai cu expresia unor gene virale timpurii caracterizează celulele transformate cu aceste virusuri.

Polyomavirusurile provoacă tumori la gazde diferite de cele naturale. Genele virale timpurii codifică antigenele T (de la *tumor*) în raport cu care se găsesc anticorpi în serul animalelor purtătoare de tumori. Interacțiunea acestor antigene cu oncogene celulare *c-myc*, *c-fos*, exacerbează expresia ultimelor.

Sinteză

Morfologia virionului și genomul viral: virioni mici (55 nm), icosaedrici, neanvelopați, 72 de capsomere. Genomul papillomavirusurilor (HPV) este ADNds, circular, dimensiune: 7,2-8,5 kD, 8 cadre de citire.

Receptorul HPV este integrina alfa 6. Situl de transcriere în nucleu. Transcriptaza: polimeraza ADN celulară II. Externalizare după distrugerea membranei celulare. Controlul replicării implică peste 20 de factori de transcriere celulari.

Boli asociate: mai multe forme de cancer umane: carcinom scuamos de col uterin, carcinom anal, vulvar, penian; CIN (*cervical intraepithelial neoplasia*), carcinom laringian, cancer esofagian. Mai multe afecțiuni dermatologice: verruca vulgaris, verruca plana, veruci genitale. Mai multe afecțiuni ORL: polipi laringieni, polipi pe corzi vocale etc.

BIBLIOGRAFIE

- Rowe WP et al. Prima izolare a unui adenovirus uman. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953;84:570-573.
- Javetz et al. Etiologia adenovirală a keratoconjunctivitei epidemice. Science 1955;122:1190.
- Trentin JJ et al. Demonstrarea oncogenității adeno 12 la șoarece nou-născut. Science 1962;137:835.
- Xia D et al. Cristalizarea domeniului care leagă receptorul CAR. Structure 1994;2:1259-1270.
- Bergelson JM et al. Receptorul CAR. Science 1997;275:1320-1323.

HERPESVIRIDAE

De reținut:

Virionul herpetic conține patru elemente: un miez electronoopic; o capsidă icosaedrică, un tegument amorf pericapsidar și, la exterior, o anvelopă cu proiecții.

Genomul este ADNds, linear, asamblat ca un toroid care circularizează cu ușurință. Fiecare spiră ADN conține două componente L (*long*) și S (*short*) mărginite de secvențe repetate inverse. Componentele L și S pot face rocade, producând forme lineare izomere care explică între altele latența.

Caractere importante: latența este definitorie pentru virusurile herpetice. Genomul viral sau o parte din el parazitează gazda pe toată durata vieții după infecția primară. Infecțiile recurente se datorează reactivării virusului latent de către stimuli inductori și transportului său prin flux axonal retrograd.

Istoric. Hippocrates și Herodotus cunoșteau herpesul, ale cărui leziuni erau interpretate ca fiind încercarea corpului de a se epura de diavol - "*herpes excretius*". Gh. Marinescu este printre primii care au demonstrat latența și transportul axonal al virusului în cursul keratitei experimentale la iepure. Herpesul rămâne modelul de elecție pentru testarea medicamentelor antivirale.

Virusologia conservă două mituri. Primul statuează că volumul cunoștințelor va fi global când numărul cercetătorilor va atinge numărul perechilor de baze din genomul herpetic (aprox. 152 000). Al doilea, că multe experimente sunt repetate mereu cu o ciudată amnezie a descoperirilor trecute. Cât anume sunt noutăți în imensa bibliografie adunată an de an în herpesvirusuri rămâne o sarcină dificilă. Totuși, progrese interesante se adună și ele au implicații atât pentru virusologie, cât și pentru oncologie, biologie moleculară, biotehnologie etc.

CLASIFICARE

Din cei aproape 100 de membri ai familiei herpesviridae, 8 patogeni umani și 8 ai primatelor nonhominoide (dar care pot afecta omul) au fost clasificați în 3 subfamilii sintetizate în tabelul 30.1.

TABELUL 30.1

PRINCIPALII PATOGENI DIN FAMILIA HERPESVIRIDAE

Subfamilia	Reprezentanți - herpes uman (HH)	Sediul latenței
Alphaherpesvirinae	Herpes simplex 1 (HSV 1 - facial) - HH1 Herpes simplex 2 (HSV 2 - genital) - HH2 Virus varicela-zoster (VZV) - HH3	Neuronii senzitivi din rădăcina posterioară a nervilor spinali și nucleii senzitivi ai nervilor cranieni
Betaherpesvirinae	Virus citomegalic (CMV) - HH5 Virus herpetic uman 6 - HH6 Virus herpetic uman 7 - HH7	Limfocitul T, monocite, organe solide (plămâni, rinichi) +/- epiteliul glandelor salivare
Gammaherpesvirinae	Virus Epstein-Barr (EBV) - HH4 HH8 (asociat sarcomului Kaposi)	Limfocitul B, endoteliul capilar

CARACTERISTICILE HERPESVIRUSURILOR UMANE

HIPERPESVIRUSES

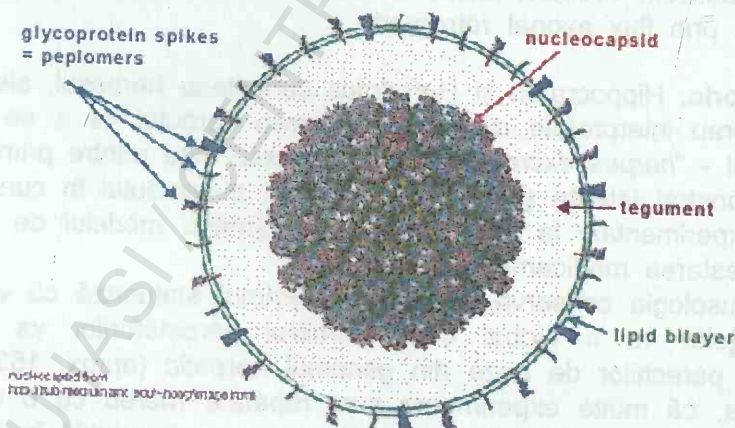


Fig. 30.1. Structura virionului și organizarea genomică sunt similare pentru toate cele 8 herpes virusuri umane. Genomul are trei învelișuri: capsidă, tegument, anvelopă.

Virionul cu dimensiuni cuprinse între 180-200 nm este alcătuit de la exterior spre interior din (fig. 30.1):

- *anvelopa cu proiecții (spikes) glicoproteice*, cu ajutorul cărora virusurile se atașează la receptorii celulari și care conțin epitopi implicați în generarea răspunsului imun;
- *tegument* - o regiune proteică ce apare amorfă în microscopia electronică;
- *nucleocapsida*, cu simetrie icosaedrică;
- *genomul ADNds*, linear, asamblat ca un toroid (în forma bobinei de inducție) și asociat cu o ADN polimerază. Pe fiecare spirală ADN există o regiune unică lungă (UL) și una scurtă (US) mărginite de secvențe repetate inverse, ce permit rearanjarea regiunilor, astfel încât genomul viral poate exista în mai multe forme izomere. Genomul herpesvirusurilor este ADNds, linear dar el se circularizează spontan, imediat după decapsidare, în nucleii celulelor infectate. Variabilitatea genomică între tipurile de virusuri herpetice este determinată de prezența unor secțiuni repetitive unice sau multiple, la capetele sau în interiorul genomului. În funcție de dispoziția acestor secțiuni se realizează 5 categorii de genom herpetic (de la A la E), expuse în figura 30.2.

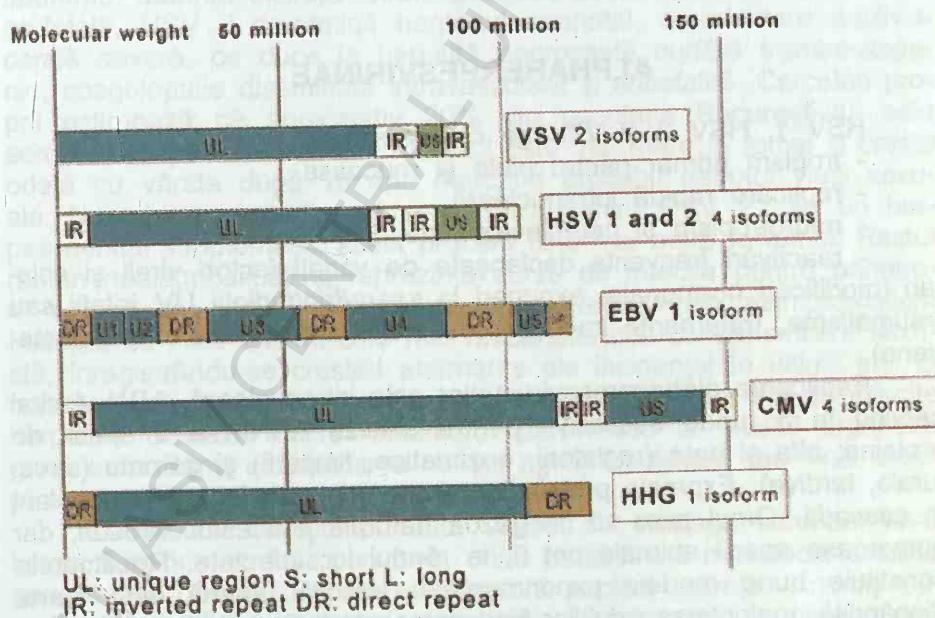


Fig. 30.2. Formele izomere ale genomurilor herpetice: A - segmente repetate inverse terminale (IR), 2 izomeri; B - segmente repetate inverse lungi terminale, 4 izomeri; C - 4 segmente repetate directe interne, 1 izomer; D - segmente repetate interne și terminale, 4 izomeri; E - cupluri (tandemuri) de segmente repetate directe terminale, 1 izomer.

Multe proprietăți biologice ale herpesvirusurilor sunt determinate de aranjamentul secvențial al genomului și de prezența formelor izomere. Cele trei subfamii de virusuri herpetice diferă fundamental în privința proprietăților biologice și strategia replicării reflectă aceste deosebiri. Aranjamentul grosier al genomului este similar la toate herpesvirusurile. Fiecare genom posedă o regiune unică lungă (UL) și o secvență unică scurtă (US) legate prin repetiții inversate (IR și DR). Dimensiunea precisă a elementelor de legătură diferă între alfa, beta și gammaherpesvirusuri.

Gradul de similitudine al secvențelor de aminoacizi codificate de perechi de gene individuale indică prezența unor omologi funcționali. Conținutul și ordinea genelor în regiunea scurtă (US plus copiile IR care o flanchează) diferă mai mult la aceste virusuri decât în regiunea UL, evident ca rezultat al unor evenimente recombinazionale. Aceste comparații arată în mod definit că HSV 1, HSV 2 și VZV au un ancestor comun. Secvențele pentru virusul citomegalic uman (betaherpesvirinae), Epstein-Barr virus și herpesvirus saimiri (gammaherpesvirinae) sugerează că acestea sunt înrudite numai la distanță cu alphaherpesvirinae.

ALPHAHERPESVIRINAE

HSV 1, HSV 2 și VZV se caracterizează prin:

- tropism primar pentru piele și mucoase,
- replicare rapidă intranucleară,
- neurotropism și neuroinvazivitate,
- reactivări frecvente declanșate de variați factori virali și celulari (modificări hormonale, expuneri la soare/frig/radiații UV, iritații sau traumatisme, tratamente imunosupresoare, coinfecții virale sau bacteriene).

Replicarea alphaherpesvirusurilor este intranucleară, ADN-ul viral servind în 3 runde succesive pentru sinteza ARNm a 3 specii de proteine: alfa și beta (reglatorii, enzimatice, timpurii) și gamma (structurale, tardive). Expresia proteinelor virale este coordonată într-un lanț în cascadă. Omul pare să fie gazda naturală a acestor virusuri, dar numeroase specii animale pot fi, la rândul lor, infectate. Rozătoarele constituie bune modele experimentale. Infecția umană este foarte răspândită, majoritatea adulților fiind seropozitivi. Prototipul familiei este herpes simplex (HSV), cu două tipuri antigenice HSV 1 și 2, cu crossreactivitate antigenică, dar cu modele proprii de seroneutralizare și simptomatologie clinică distinctă.

HSV 1 are un genom ADNds care conține circa 75 de gene. Infecția este inițiată când virusul ajunge în zone lezate ale pielii sau

mucoaselor. Glicoproteinele anvelopei virale asigură adsorbția HSV 1 de proteoglicanii membranei celulare (receptorii virali), iar virusul se internalizează prin fuziune. În cursul infecției litice, genele virale se exprimă într-o manieră temporal dirijată începând cu genele imediat timpurii (IE). Curând după pătrunderea în nucleul celulelor infectate, cinci gene IE sunt transcrise în cascadă asigurând controlul secvențelor ulterioare ale ciclului replicativ. Două gene IE (ICP4 și ICP27) condiționează propagarea HSV 1 numai în celule permissive. Mutantele virale cu deleții ale acestor gene se replică numai în celule gazdă care oferă produsele genelor absente. Mutantele deletate constituie suportul creării vectorilor virali herpetici utilizați în prezent în terapia oncolitică sau în terapia genică.

HSV 1 este asociat obișnuit localizărilor periorale (herpesul labial, gingivostomatita herpetică, faringita). Complicațiile de temut ale infecțiilor cu virusuri herpes simplex 1 sunt keratoconjunctivita herpetică, cu frecvente ulcerări corneene, și encefalita herpetică, cu mortalitate peste 70%.

HSV 2 determină herpesul genital, o boală cu transmitere sexuală. Transmiterea virusului se poate realiza și în absența leziunilor aparente, datorită excreției virale asimptomatice. În transmitere matern-fetală, HSV 2 determină herpesul neonatal, cu afectare multiviscerală severă, ce duce la hepatită necrozantă cu/fără trombocitopenie, coagulopatie diseminată intravasculară și encefalită. Cercetări proprii estimează că apoximativ 20% din populația Bucureștiului este seropozitivă pentru HSV 2. Procentul este mai mare la femei și crește odată cu vârsta după 15 ani, marcând probabil debutul vieții sexuale. Numai un sfert din cei seropozitivi pentru HSV 2 au un herpes genital simptomatic, acest procent fiind mai mare la femei. Restul rămân nediagnosticați și reprezintă surse de infecție pentru partenerii sexuali în cursul episoadelor de excreție virală asimptomatică. Infecțiile cu HSV 2 sunt cele mai răspândite boli cu transmitere sexuală, înregistrându-se creșteri alarmante ale incidenței în ultimii ani. O caracteristică agravantă este faptul că majoritatea cazurilor de infecție herpetică creează infiltrat inflamator pelvin sau la nivelul organelor genitale facilitând contaminarea cu alți agenți bacterieni sau virali sexual transmiși (HIV, HPV etc.).

Consecutiv infecției primare, virusul se propagă centripet de-a lungul fibrelor nervoase senzitive, unde parazitează noncitocid celulele ganglionilor dorsali. Replicarea abortivă explică latența. Anumiți stimuli, ca: modificări hormonale (exemplu: menstruația), expunerea prelungită la soare sau frig, iritații sau traumatisme (herpes gladiatorum), tratamente imunosupresoare, determină reactivarea virusului herpetic latent și apariția leziunilor herpetice în teritoriul cutanat inervat de ganglionii parazițați. Reactivările se produc în ciuda prezenței unor niveluri ridicate de anticorpi antiherpetici la subiecții infectați. Este un

paradox aparent, pentru că subiecții fără anticorpi (care nu au făcut nici infecția primară) nu au reactivări, în timp ce titrul anticorpilor specifici este ridicat la cei cu leziuni periodice datorită tocmai reacțiilor anamnestice determinate de recăderi. În fapt, anticorpii nu pot neutraliza virusul latent în ganglionii senzitivi.

Virusul varicela-zoster (VZV) se transmite pe cale aerogenă, determinând varicela, viroză eruptivă a copilăriei, deosebit de contagioasă. Reactivările virusului latent apar după mai multe decade, sub forma zonei zoster, erupție herpetiformă pe teritoriul cutanat inervat de un ganglion senzitiv, în care există virusul latent. Nevralgia post-zona zoster persistă 4-5 luni de la dispariția leziunilor, punând probleme speciale de tratament analgic. VZV este un virus monotipic ce parazitează numai omul, menținerea lanțului epidemic fiind posibilă numai datorită latenței sale și reactivărilor. De curând s-a introdus în practica pediatrică un vaccin viu atenuat antivarielos, obținut prin treceri repetate ale virusului pe culturi de fibroblaste diploide umane. Vaccinul Varivax® se administrează copiilor între 19-35 de luni și conferă protecție semnificativă cel puțin în primii cinci ani. Ulterior, imunitatea diminuează și este posibilă infecția în momentul expunerii la virusul sălbatic. Apariția unor epidemii în colectivitățile vaccinate a impus recomandarea unei a doua doze de vaccin la vârsta de 6-7 ani. Vaccinul poate fi administrat simultan cu trivaccinul rujeolos-rubeolos-urlian. Costul vaccinului este de 50 \$ pentru o doză.

Aplicarea în masă a Varivax® în Statele Unite a evidențiat și efectul asupra incidenței zona zoster la adulți, care pare să diminueze în frecvență și să aibă o evoluție mai blândă.

REPLICAREA ALPHAHERPESVIRUSURILOR

Atașarea la receptori (proteoglicani de tipul heparansulfat) este primul stadiu al infecției. Urmează fuziunea anvelopei cu membrana citoplasmică și transportul nucleocapsidei către nucleu. În nucleu, ADN viral se circularizează și servește în trei runde succesive ca matrită pentru ARNm ai celor trei specii de proteine virale alfa, beta și gamma. Asamblarea virionilor maturi are loc, de asemenea, secvențial, asigurându-se producția particulelor cu toate învelișurile pericapsidare.

Două aspecte importante au fost recent descifrate:

- neurovirulența și neuroinvasivitatea, respectiv, neurotropismul și replicarea intra SNC;
- latența și reactivarea, respectiv, siderarea replicării într-o anumită fază și reluarea cascadei în urma a 2 categorii de factori: virali și celulari.

Recurențe severe ale infecțiilor cu alphaherpesvirusuri apar la pacienții imunocompromiși (de exemplu: HIV pozitivi sau transplantați și imunosupresați farmacologic) sub forma unor erupții cutanate diseminate, care răspund greu la medicamentele antiherpetice (exemplu: acyclovir).

Tratamentul cu **acyclovir**, un analog nucleozidic aciclic, a diminuat marcat severitatea simptomatologiei infecțiilor herpetice și a contribuit la scăderea frecvenței și gravității recurențelor. Acyclovirul (ACV) a fost descoperit de Gertrude Elion, laureata premiului Nobel pentru Medicină în 1988. Acyclovirul este un analog nucleozidic purinic, derivat din guanină, de care diferă structural prin prezența unei catene laterale aciclice. Acyclovirul își exercită efectul antiviral pe virusurile herpes simplex (HSV) și varicela-zoster (VZV) prin interferarea sintezei ADN și inhibarea replicării virale. Activitatea antivirală a acyclovirului depinde în principal de conversia intracelulară a medicamentului în *acyclovir trifosfat*. Acyclovirul este convertit în acyclovir monofosfat sub acțiunea timidin kinazei virus codificate; apoi monofosfatul trece în difosfat și trifosfat sub acțiunea unor fosfataze celulare. Acyclovir trifosfatul este forma activă farmacologic a medicamentului ce blochează elongația lanțului ADN viral progen prin încorporare în genomul viral (tabelul 30.II).

Alături de acyclovir, se utilizează derivați ai săi cu biodisponibilitate orală superioară, de tipul **valacyclovir** și **famciclovir**. Cunoștințele actuale arată că, în stare latentă, virusul nu se replică activ și, ca urmare, nu este susceptibil la acțiunea antivirală a unor medicamente ca acyclovir. Aceste medicamente sunt incapabile să elimine o infecție latentă stabilă.

TABELUL 30.II

Acyclovir Monofosfat→	Acyclovir Difosfat→	Acyclovir Trifosfat
TKinaza virală→	Kinaza celulară→	Kinaza celulară→ Compus activ

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE CU ALPHAHERPESVIRINAE

Izolarea se realizează optim din lichidul veziculelor herpetice care conține titruri înalte de virus în cazul leziunilor recente (24-48 de ore). Pentru virusurile HSV 1 și 2 efectul citopatic caracteristic apare în primele 2-3 zile de la inoculare și se răspândește rapid. Dimpotrivă, pentru VZV replicarea virală se evidențiază printr-un efect citopatic focal, care apare lent și se răspândește în 1-2 săptămâni.

Celulele infectate cu HSV sau VZV apar balonizate, hiperchrome, multinucleate. Dacă se urmărește evidențierea antigenelor virale se recoltează material celular infectat prin raclare de la baza leziunii și se recurge la detecția histochimică a incluziilor intranucleare acidofile - corpii Cowdry A - prin colorații Wright sau Giemsa (incluzii Tzanck) sau se identifică cu anticorpi specifici monoclonali marcați cu fluorocromi. Diagnosticul direct prin imunofluorescență este cel mai potrivit pentru VZV. Determinarea anticorpilor antiherpetici în ser este utilă doar în infecțiile primare, la imunocompetenți și se realizează prin ELISA sau imunofluorescență. În majoritatea cazurilor însă asistăm la recurențe ale infecțiilor latente sau la superinfecții ce survin tocmai la pacienții care au titruri înalte de anticorpi.

Prin identificarea și caracterizarea glicoproteinelor anvelopei virale s-a reușit evidențierea faptului că glicoproteina G (gpG) este responsabilă de specificitatea antigenică de tip a HSV, specificitate care se traduce prin răspunsul diferențiat în anticorpi al gazdei. S-au elaborat teste ELISA suficient de performante care diferențiază anticorpii anti-HSV 1 de cei anti-HSV 2. Testele de confirmare sunt de tip Western blot.

Examinarea secvențelor ADN a adus precizări în evaluarea funcțiilor genelor. O genă remarcabilă este LATs (*latency-associated transcripts*). Aceasta produce un set de specii ARN în neuronii infectați latent, care sunt singurele transcriptii virale detectabile.

Mutațiile în regiunea de codificare a LATs au fost semnalate ca afectând intrarea sau ieșirea din starea de latență. Secvențele ADN ale regiunii corespunzătoare aparent la LAT sunt cunoscute pentru toate herpesvirusurile. Toate prezintă o structură similară cu HSV 1 și HSV 2 cu un tractus extins necodificator în aval de omologul genei RL2. Apare astfel că elementele LAT au fost conservate în evoluția acestor virusuri, sugerând categoric că aici se plasează o funcție semnificativă. Analizând natura funcției LAT, aceasta are două componente: în primul rând, aceea că una sau mai multe specii LAT pot fi un ARNm funcțional ce exprimă proteine și, în al doilea rând, că LATs poate acționa ca un inhibitor antisens al expresiei genelor RL2.

BIBLIOGRAFIE

- Weller H. Prima izolare a VZV în culturi de celule. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953;83:340-346.
- Davison AJ, Scott JE. Secvențierea completă a genomului VZV. J. Gen. Virol. 1986;67:1759-1816.

BETAHERPESVIRINAE

Cel mai răspândit betaherpesvirus este **virusul citomegalic - CMV**. El se caracterizează prin:

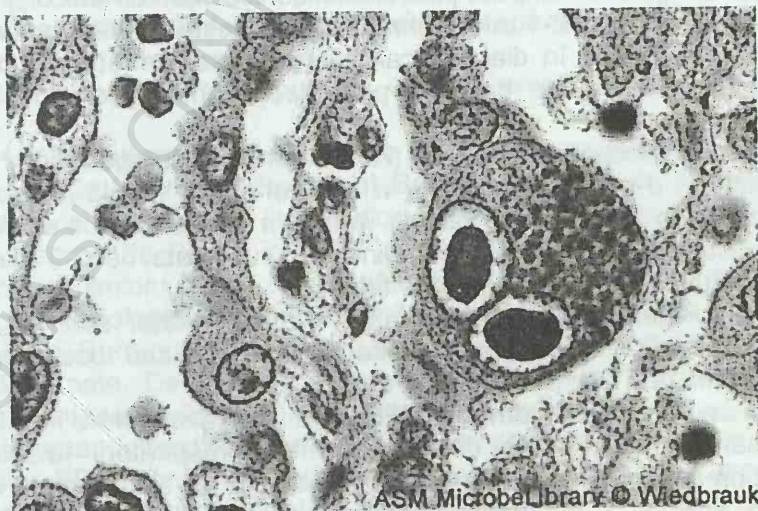
- replicare lentă,
- citopatogenicitate redusă,
- latență prelungită,
- dependența replicării de stadiul mitotic al celulei gazdă,
- capacitatea de a traversa placenta și de a produce malformații la făt.

CMV are sedii de latență multiple - de la cel clasic - limfocitul T, la organe solide (plămâni, rinichi), iar reactivările sunt legate în particular de scăderea imunității gazdei, indusă iatrogen sau secundară infecției cu HIV. Infecția cu CMV este în majoritatea cazurilor asimptomatică, dar poate îmbrăca forme severe la persoanele imuno-compromise. Astfel,

- în cazul transplantului de organ, CMV determină în primele 6 luni posttransplant o pneumonie severă, cu letalitate ridicată (75%),
- la pacienții HIV pozitivi determină retinită și encefalite,
- la transfuzați, o infecție *mononucleosis-like*.

Transmiterea materno-fetală a CMV poate surveni:

- Prenatal - este teratogen, determină malformații congenitale severe (microcefalie, retard mental, chorioretinită, anomalii osoase).
- Perinatal - determină "boala cu incluzii citomegalice a nou-născutului" (caracterizată de hepatosplenomegalie, icter, anemie hemolitică).
- Postnatal - infecție asimptomatică sau asemănătoare mononucleozei (vezi mai jos) (fig. 30.3).



ASM Microbel Library © Wiedbrauk

Fig. 30.3. Efectul citopatic "în ochi de bufniță" - incluzii intranucleare - al CMV.

CMV poate fi reactivat și excretat la astronauți în cursul călătoriilor spațiale datorită microgravitației!

Un medicament înrudit structural și farmacologic cu acyclovirul, **ganciclovir**, administrabil intravenos, și un derivat al său **valganciclovir**, administrabil per os, precum și alți doi compuși anti-CMV: **cidofovir** (indicat în retinita citomegalică la pacienții cu SIDA) și **foscarnet**, sunt activi în infecția cu CMV.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE CU BETA-HERPESVIRINAE

CMV este excretat lungi perioade asimptomatice, ca și în timpul infecțiilor diseminate, astfel încât un rezultat pozitiv la izolarea pe culturi este greu de interpretat. Acest lucru este important pentru diagnosticul infecției congenitale, pentru că un astfel de copil continuă excreția de virus ani de zile. CMV crește pe fibroblaste diploide umane producând un efect citopatic (ecp) focal cu celule gigante rotunjite, refringente, cu răspândire foarte lentă. Focarele de ecp se dezvoltă pe parcursul a 3-4 săptămâni de la inocularea culturilor în funcție de titrul infectant. Aceste celule balonizate cu incluzii refractile sunt extrem de caracteristice și au dat numele virusului. O metodă foarte sensibilă de diagnostic este cultura rapidă a virusului pe lamele individuale, care sunt centrifugate la viteză mică după inocularea produsului patologic, ceea ce permite grăbirea adsorbției virusului și evidențierea antigenelor timpurii prin imunofluorescență cu anticorpi monoclonali, după numai 2-4 zile. Tehnica se numește *spin-enhanced culture*. Serologia, atât în diagnosticarea primoinfecției materne, cât și a infecției congenitale, se bazează pe detecția anticorpilor specifici de tip IgM.

Virusul herpetic uman 6 (HH6) este un patogen semnificativ în pediatrie, determinând boala a 4-a eruptivă febrilă a copilului, cunoscută sub numele de *roseola infantum* sau *exanтем subit*. Este o erupție maculo-papulară nepruriginoasă, cu durată de 2-3 zile, precedată și urmată de un sindrom febril.

N.B. *Restul bolilor eruptive ale copilăriei sunt: 1. rujeola; 2. scarlatina; 3. rubeola; 5. eritemul infecțios sau boala obrajilor palmuți, cauzată de parvovirusul B19.*

Virusul herpetic uman 7 (HH7) a fost descoperit în 1990 la adulți sănătoși. El poate determina infecții respiratorii la pacienții imunosupresați și pare a acționa ca un cofactor în sindroamele induse de HH6. HH6 și 7 au tropism pentru limfocitele T CD4⁺, celule țintă în infecția HIV, iar sediul latenței este în glandele salivare.

BIBLIOGRAFIE

- Salahuddin Z et al. Izolarea human herpesvirus 6 (HH6). Science 1986;234:596.
- Meignier B et al. Tulpină atenuată vaccinantă (virus recombinant prin inginerie genică) R7020 - pentru imunizare împotriva herpesului genital. J. Infect. Dis. 1988;158:602.
- Yamanishi K et al. HH 6 determină exanthema subitum. Lancet 1988;i:1065-1067.
- Schrimer EC et al. HH 6 a fost divizat în HH 6A și HH 6B. PNAS 1991;88:5922-5929.
- Frenkel N et al. Izolarea human herpesvirus 7 (HH 7). PNAS 1990;87:748- 752.

GAMMAHERPESVIRINAE

Gammaherpesvirinaele umane sunt reprezentate de două virusuri remarcabile prin capacitatea lor transformantă in vitro și oncogenă in vivo: **virusul Epstein-Barr (EBV) - HH4** și **virusul herpetic uman 8 (HH8)**, cunoscut și sub numele de **virusul asociat sarcomului Kaposi**. EBV are un spectru îngust de gazdă, infectând numai anumite subseturi celulare specializate funcțional:

- epiteliul orofarinxului, la nivelul căruia determină o infecție productivă, dar pasageră - *mononucleoza infecțioasă*,
- limfocitele B, unde infecția este neproductivă, dar conduce la latență, stimulare policlonală și, uneori, la transformare celulară.

Mononucleoza infecțioasă apare la adolescenți și se manifestă prin febră, faringită, adenopatii (mai ales, suboccipitale), splenomegalie și modificări caracteristice ale frotiului sanguin. Aceeași simptomatologie caracterizează și infecțiile posttransfuzionale cu CMV. Infecția latentă în limfocitele B determină activarea policlonală a limfocitelor B cu proliferare benignă.

Sunt descrise trei tipuri de latență asociată virusului **Epstein-Barr**:

1. Cu antigene virale asociate EBNA - *Epstein-Barr nuclear antigens*, situație întâlnită în **limfomul Burkitt**. Acest tip de tumoră, caracterizată prin proliferarea limfocitelor B care invadează țesuturile moi, a fost descris de Burkitt în 1958 la copiii africani. Datorită caracterului endemic al limfomului în zonele afectate masiv de malarie s-a sugerat ca agent etiologic un virus transmis de țânțari. Mai târziu însă, Epstein și Barr au identificat adevărata cauză în herpesvirusul ce le poartă numele. De fapt, se pare că anemia indusă de malarie determină o hiperactivitate compensatorie a celulelor măduvei osoase hematogene, favorizând translocății cromozomiale ce duc la activarea virusului EBV. Limfomul Burkitt este asociat cu anomalii cromozomiale caracteristice (translocății 8/14, 8/2 sau 8/22 - între cromozomul 8 ce conține o oncogenă celulară **c-myc** și cromozomii 14 - ce conțin

o genă care codifică lanțul greu al imunoglobulinelor, sau cromozomii 2, respectiv, 22, ce codifică lanțurile ușoare kappa/lamda ale imunoglobulinelor.

2. Cu antigene asociate LTA - *latency tumoral antigens*, descris în **carcinomul nazofaringian, limfomul Hodgkin și limfoame ale celulelor T (complicații SIDA)**. Carcinomul nazofaringian este endemic în sud-estul Asiei.

3. Cu antigene asociate LMP - *latent membrane proteins*, întâlnit în **boala limfoproliferativă posttransplant**.

Incidența cancerelor postinfecție EBV este un eveniment extrem de rar. În carcinogeneză intervin și alți cofactori, căci o mare proporție din populație are anticorpi anti-EBV, fără să dezvolte ulterior tumori. În infecția HIV, EBV este frecvent reactivat, fiind implicat în etiologia unei stomatite hiperplazice particulare - leucoplazia vilooasă a limbii și a unor limfoame.

Herpesvirusul uman 8 - HH8 - este implicat în apariția **sarcomului Kaposi**, un cancer al celulelor endoteliale, caracterizat prin proliferarea anormală, haotică, a celulei imature pluripotente endoteliale, cu angiogeneză și neoformare de conglomerate vasculare atipice. Pe piele sau pe mucoase, apar zone hiperchrome, indolore, dar extrem de friabile, ce determină hemoragii masive. Există mai multe forme de sarcom Kaposi:

- **Clasic**, cu incidență mare la adulții vârstnici de sex masculin, cu descendență mediteraneană și la evreii din Europa de Est. Se manifestă cutanat, pe membre.

- **African**, ce apare la persoane tinere, afectează în mod egal ambele sexe și ia forma unei limfadenopatii generalizate agresive.

- **Asociat medicației imunosupresoare** din transplant, regresează odată cu oprirea terapiei.

- **Asociat infecției HIV**, pare a fi forma cea mai frecventă în prezent, o **afecțiune indicatoare pentru SIDA**, caracterizată de apariția unor noduli sau peteșii violacee pe membre sau pe viscere, ce dau naștere unor hemoragii masive pulmonare și gastrointestinale. Răspunde bine la tratamentul intralezional cu interferon.

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN INFECȚIILE CU GAMMAHERPESVIRINAE

În funcție de profilul serologic al infecției EBV se disting 4 categorii de pacienți:

- fără istoric de infecție,
- pacienți cu infecție acută,

- pacienți cu infecție veche,
- pacienți cu reactivare a infecției latente.

Concis, prezența anticorpilor din clasa IgM în raport cu antigenul viral capsidar (anti-VCA) denotă infecția acută, prezența anticorpilor anti-VCA, IgG și anti-EBNA (*Epstein-Barr nuclear antigen*) semnifică infecția veche. În cazul reactivării infecției latente sunt prezente ambele categorii de anticorpi. Este uneori greu de diferențiat infecția acută de cea reactivată (tabelul 30.III).

TABELUL 30.III

TABLOUL SEROLOGIC LA SUBIECȚI ÎN DIFERITE STADII ALE INFECȚIEI EBV

Stadiul EBV	Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA-IgG
Susceptibil	Negativ	Negativ	Negativ
Infecție primară acută	Pozitiv/Negativ	Pozitiv	Negativ
Infecție veche	Pozitiv	Negativ	Pozitiv
Reactivări	Pozitiv	Pozitiv/Negativ	Pozitiv

Toți bolnavii cu infecții EBV cronice latente prezintă în comun particularități ale răspunsului în anticorpi la antigenele virusului EB. În principal, se evidențiază anticorpi caracteristici infecției latente (1) și anticorpi de tip IgM și IgA caracteristici infecției litice (2). În prima categorie menționăm titrurile crescute ale anticorpilor anti-EB nucleari (EBNA) și ale anticorpilor care recunosc antigenele capsidare tardive necesare pentru maturarea virală (VCA). În a doua categorie se înscriu anticorpii care reacționează cu proteine timpurii necesare replicării ADN viral (EA). Tabloul serologic înregistrat la acești bolnavi este rezumat în tabelul 30.IV.

TABELUL 30.IV

SEROLOGIA INFECȚIILOR CU VIRUSUL EPSTEIN-BARR

Clinica	Anti-EBNA	Anti-EA		Anti-VCA	
		IgM	IgG	IgM	IgG
MI	Negativ	+	+	++	++
L. Burkitt	++	Negativ	++	Negativ	++
CNF	+	Negativ	Negativ	Negativ	+

Detecția încărcării virale (VL = *viral load*) și a răspunsului imun (RI) celular în raport cu diferite antigene EBV a adus un progres semnificativ în diagnosticul precoce al riscului unor boli limfoproliferative relate cu infecția EBV cronică. În mod obișnuit EBV se replică în limfocitele B. Infecția timpurie în copilărie este de regulă asimptomatică. Infecția adolescenților și adulților determină mononucleoză infecțioasă (MI). După infecția primară la subiecți imunocompetenți

apar limfocite T citotoxice (CTL) specifice EBV care vindecă infecția. La subiecți cu deficiențe imune infecția EBV devine persistentă. Condițiile clinice asociate persistenței sunt bolile limfoproliferative la imunosupresați (în SIDA, de exemplu) sau infecțiile cronic active mai ales la asiatici, care pot dezvolta CNF (carcinom nazofarigian) (tabelul 30.V).

TABELUL 30.V

SUMARUL RĂSPUNSULUI IMUN CELULAR ȘI AL ÎNCĂRCĂRII VIRALE ÎN INFECȚIA EBV

Boala	Limfocit țintă	RI celular	VL (copii/mgADN)
MI	B	CTL crescute	10^{2-3}
Limfoproliferări maligne	TCD8	Cascadă limfokine	$>10^5$
CNF	TCD4 ⁺	NK crescute	10^4

TABELUL 30.VI

COMPARAREA DIMENSIUNILOR VIRIONILOR HERPETICI

Virusul	Diametrul virionului (nm)	Lungimea genomului kb (G+C%)	Unități de transcriere
Alphaherpesvirinae			
Herpes simplex 1, 2	105	>152 (68)	86
Human Herpes 3 - VZV	150-180	125-150 (50)	70-80
Betaherpesvirinae			
Human Herpes 5 Cytomegalovirus	150-200	180-240 (46)	208
Human Herpes 6	160-200	140-170 (43)	110
Human Herpes 7			
Gammaherpesvirinae			
Human Herpes 4 - EBV	180-200	172	>84
Human Herpes 8 Virus asociat sarcomului Kaposi			

Sinteză (tabelul 30.VI)

Alphaherpesvirinae

HSV 1, HSV 2 și VZV au genom ADNds, linear, cu 70-80 cadre de citire.

Organizarea genomului: genomul complet are ~150 kb și conține două segmnete legate covalent, desemnate: lung (L) și scurt (S),

ambele flancate de secvențe repetitive inversate. Genomul se poate izomeriza ca urmare a rocadei L/S pe fiecare spirală - acest fenomen a fost implicat în explicarea latenței. Unica secvență scurtă poate face rocada în raport cu secvența lungă, producând două izoforme.

Replicare: internalizare: fuziunea anvelopei cu membrana celulară. Situl replicării: nucleul. Transcriptaza: ARN polimeraza II a gazdei. Replicaza - virală ADN dependentă de ADN plus factori ai gazdei. Asamblare în nucleu; transport de la membrana nucleară la spațiul extracelular. În expulzarea virionilor progeneri din celula parazitată se descriu doi pași:

- înmugurire la nivelul membranei nucleare;
- înmugurire la nivelul membranei celulare după adiția tegumentului și anvelopei în citosol

Betaherpesvirinae

CMV este herpesvirusul cu cel mai complex genom și cel mai adaptat la gazda umană. Tulpini de referință: AD169, Towne, Toledo, Davis, Tofan (România).

Boli determinate: boala incluziilor citomegalice (la nou-născuți) - avort spontan sau malformații congenitale sau infecții SNC cu handicap psihomotor consecutiv. Patologie posttransplant - viremie și rejecția greței (în cazul cuplului donator - primitor de grefă heterolog din punct de vedere al infecției CMV). Patologie posttransfuzională - afecțiuni asemănătoare mononucleozei. Retinita CMV (la bolnavii SIDA) - inflamație retiniană, orbire.

Gammaherpesvirinae

EBV are structură similară altor herpesvirusuri. Alcătuirea genomului este diferită: 5 secvențe unice delimitate de 4 secvențe interne și două secvențe terminale repetate. Genomul se circularizează după internalizare prin recombinarea omoloagă a secvențelor terminale.

Replicare: internalizarea este mediată de receptorul CD21 (receptorul C3d) și se face prin endocitoză sau prin fuziunea celulelor infectate cu cele vecine. Transcriptaza: ARN polimeraza II și III a gazdei. Replicaza - celulară (în latență) sau virală în infecția productivă. Eliberarea din celulă în pași succesivi: înmugurire la nivelul membranei nucleare, transport prin reticulul endoplasmic, exocitoza la nivelul membranei celulare.

Boli asociate: mononucleoza infecțioasă: afecțiune febrilă cu adenopatie cervicală și rash. Carcinomul nazofaringian (CNF) - limfom cu celule T sau NK în fosa retronazală. Limfomul Burkitt - limfom cu celule B mai mult la copii; în două forme:

- Endemic în Africa sau America de Sud - 95% EBV pozitiv.
- Sporadic în restul lumii, numai 15-25% EBV pozitiv.

Limfomul Hodgkin cu celule Reed-Sternberg - 30-90% EBV pozitiv. Leucoplakia orală păroasă - la bolnavi HIV infectați - leziuni pe mărirea limbii. Leiomiiosarcom - tumori ale mușchilor netezi.

Limfoame cu celule B sau T (asociate cu infecția HIV). De notat frecvența transmisie iatrogenă a EBV prin transfuzii.

BIBLIOGRAFIE

Burkitt D. Burkitt descrie limfomul omonim la copiii africani. Br. J. Surg. 1958;46:218-224.

Barr YM. Descrierea virionilor herpetici în culturile din limfom Burkitt. Epstein MA. Lancet 1964;i:702-703.

Pope JH. EBV imortalizează limfocitele umane. 1967;39:933-945.

Weiss LM. Asocierea EBV cu patologia limfomului Hodgkin. Am. J. Pathol. 1987;129:86-91.

POXVIRIDAE

De reținut:

Virioni paralelipipedici, 250 x 450 nm, cu morfologie complexă. Genom ADNds, codificând peste 300 de gene. Multe gene neesențiale pentru replicare pot fi substituite de gene structurale ale altor virusuri în vaccinurile hibride care conțin și imunogeni pentru hepatită B, gripă, rabie, HIV etc.

Caractere importante: sunt virusurile cele mai complexe care, în ciuda eradicării principalului patogen uman (virusul variolic), vor continua să fie studiate ca vectori în biotehnologie, ca modele pentru studiul imunității mediate celular dar, mai ales, ca posibil agent în bioterorism.

Istoric. Virusurile din grupul variolo-vaccinei marchează pietre de hotar în evoluția medicinei: introducerea vaccinării ca mijloc profilactic (Jenner, 1796), prima viroză eradicată (OMS, 1979), primul virus utilizat ca vector pentru gene specificând antigene protectoare împotriva altor infecții etc.

În afara virusurilor pox care determină boli la om, această familie cuprinde numeroase alte specii care infectează animale domestice de interes economic, precum și nevertebrate (insecte). Reamintim că un poxvirus (virusul mixomatozei la iepure) a fost utilizat cu succes în controlul biologic al unor animale (iepuri) care amenințau echilibrul ecologic al unor biotopuri australiene.

Denumirea poxvirusuri provine de la leziunile cutanate caracteristice denumite în engleză "pocks". Acestea sunt leziuni proliferative ale epidermului; proliferarea fiind urmată de necroză și veziculizare.

CLASIFICARE

Poxvirusurile patogene pentru om se grupează în două genuri:

1. *Orthopox* (grupul variolo-vaccinei);

2. **Parapox** (*grupul orf*) cuprinde virusuri transmise de la animal la om (zoonoze).

Dintre *orthopoxvirusuri* (sau grupul vaccinei) menționăm:

- **virusul variolei** - patogen exclusiv pentru om, eradicat în prezent;

- **virusul vaccinei** (*Buffalopox*) - tulpină de laborator derivată probabil prin recombinări genetice din virusul variolei sau cowpox;

- **virusul cowpox** (*Brighton, Lister* - tulpina vaccinală) - probabil patogen natural pentru rozătoare, infectează accidental omul, direct sau prin intermediul altor gazde accidentale (vacă, pisică);

- **virusul monkeypox** - (*Congo, Zair, Liberia*) - patogen al faunei sălbatice (izolat inițial la maimuțe captive) care accidental infectează omul determinând erupții generalizate asemănătoare variolei, dar care se transmit excepțional de la om la om.

Din grupul *parapoxvirus* (*grupul orf*) două virusuri pot afecta omul, prin contaminare de la animale (zoonoze): **virusul orf** și **virusul paravaccinal** (determină "nodulii lăptarului"). Leziunile cutanate localizate sunt tipice pentru aceste infecții.

Dintre agenții neclasificați din familia *poxviridae*, ***molluscum contagiosum*** este un patogen exclusiv al omului, interesant pentru dermatologi (genul *molluscipoxvirus*). Boala sinonimă constă din noduli multipli, discreți, limitați la epiderm, care pot apărea oriunde pe corp cu excepția plantelor și palmelor. Incubația este de 15-50 de zile, iar evoluția se poate prelungi câteva luni până la vindecarea spontană.

Virionii *poxvirusurilor* au dimensiuni mari, apropiate de cele ale bacteriilor mici (200 x 300 nm). Genomul ADNds conține aproximativ 200 de perechi de kilobaze. Nu toate genele sunt indispensabile replicării virale. Unele pot fi excizate și înlocuite de gene care codifică proteine imunogene ale altor virusuri, permițând obținerea unor vaccinuri hibride.

Genomul *poxvirusurilor* este înfășurat în mai multe straturi proteice, inclusiv o envelopă. *Orthopoxvirusurile* au tropism limitat la o singură specie. Virusul variolei poate infecta numai omul. Virusul vaccinei este o excepție notabilă, infectând atât omul, cât și bovinele. Înrudirile antigenice între variolă și vaccină au permis folosirea vaccinei pentru imunizarea antivariolică.

REPLICARE

Poxvirusurile sunt virusurile cele mai complexe și se replică exclusiv în citoplasmă. Genomul unui *poxvirus* conține peste 200 de gene din care numai 10 sunt implicate în replicare. Practic, informația genetică este suficientă pentru a asigura replicarea autonomă. Totuși, în celulele enucleate, deși *poxvirusurile* se replică, virionii progeni nu

se pot asambla. Virusurile pox conțin trei feluri de gene care se exprimă într-o secvență temporală bine stabilită:

- gene timpurii, care codifică enzime (polimeraze) și alte proteine cu rol de factori de creștere sau care interferează cu răspunsul imun;
- gene intermediare, care produc proteine ce inhibă metabolismul celulei gazdă,
- gene tardive, se exprimă după sinteza genomurilor progene, codifică proteinele structurale care vor încapsida genomul progen.

Poxvirusurile determină infecții febrile cu erupții caracteristice cutanate - rash veziculos - la om și animal. Interesul prezent pentru această familie ține de:

- potențialul folosirii virusului variolic în scop bioterorist,
- utilizarea ca vector a virusului vaccinal sau a unor aviapox-virusuri pentru prepararea unor vaccinuri hibride.

PROPRIETĂȚILE VIRUSULUI

Structura complexă a virionului pox este comună pentru toți membrii acestei familii. Nu există o capsidă cu un anumit tip de simetrie ca la alte virusuri, ci o membrană externă alcătuită din subunități lipoproteice tubulare aranjate neregulat. Miezul virionului cuprinde doi corpusculi laterali și genomul alcătuit din ADNds linear. Multiplicarea este strict intracitoplasmică, fiind asistată de o polimerază ARN virală. Toate virusurile (cu excepția variolei) infectează, în afara omului, un spectru larg de specii gazdă. Diagnosticul diferențial între poxvirusuri se face pe baza unor proprietăți biologice (dimensiunea plajelor, leziuni pe oul de găină embrionat sau la animal, hemaglutinare). Notăm inducția de anticorpi care reacționează încrucișat variolă-vaccină, precum și protecția heterologă la animalele de experiență. Antigenele virus specifice pot fi totuși recunoscute în imunodifuzie sau în imuno-electroforeză.

Date istorice privind variola - singura viroză eradicată.

Variola este cunoscută încă din Egiptul antic, mumia faraonului Ramses al V-lea prezentând leziuni caracteristice, în care a putut fi detectat virusul variolic. Boala este documentată în Europa din 710, iar în secolul al XVIII-lea a determinat epidemii de amploare similară ciumei, provocând moartea a milioane de oameni, între care și 5 monarhi europeni. În America a fost introdusă în 1520, în cursul expedițiilor lui Hernando Cortez, când a ucis 3,5 milioane de azteci în numai 2 ani. Virusul variolic este cunoscut pentru potențialul său de armă de distrugere în masă. Pături infectate cu virus variolic, distribuite de trupele britanice în America de Nord în cursul războaielor

din 1754-1767, au decimat practic triburile amerindiene. Este interesant de amintit că un alt poxvirus, patogen pentru animale (virusul myxoma din genul leporipox) a fost utilizat în controlul biologic al iepurilor domestici ce distrugeau culturile agricole din Australia.

Odată cu generalizarea vaccinării, cazurile indigene de variolă din Europa și America de Nord au scăzut treptat, între 1958-1972, fiind documentate numai 30 de focare de import. Ultimul caz de variolă în Anglia a fost în 1930, iar în România în 1947 (caz de import). În S.U.A., ultimul caz de variolă a fost raportat în 1947. Este vorba de un negustor din Mexic care a dezvoltat un prodrom infecțios (dureri de cap și spate și un rash atipic) în cursul unei călătorii cu autobuzul spre New York. Ajuns aici, vizitează câteva obiective turistice și face cumpărături într-un mare magazin, dar boala agravându-se, este internat două zile mai târziu. Va deceda după o săptămână, cu multiple hemoragii viscerale. Acest caz index generează 12 cazuri secundare (persoane spitalizate în aceeași perioadă și contacti familiari ai acestora). Toți pacienții au prezentat forme clinice de variola major, deși 3 fuseseră vaccinați antivariolic în urmă cu peste 40 de ani. Virusul a fost izolat pe membrana chorioalantoidiană (MCA) a oului de găină embrionat, iar corpii Guarnieri (incluzii intracitoplasmice caracteristice poxvirusurilor) au fost evidențiați în biopsii tisulare. Diagnosticul inițial al cazului index a luat în considerare o erupție medicamentoasă, eritem multiform și erupție variceliformă Kaposi, dar a exclus variola, datorită prezenței unei cicatrice vaccinale din copilărie, aspectului atipic al rash-ului și absenței contactului cu persoane infectate în antecedentele pacientului. Ulterior, confirmării diagnosticului de variolă, o campanie de vaccinare de o amploare fără precedent a fost inițiată în statul New York. În total au fost imunizate într-o singură lună peste 6 350 000 de persoane. A fost un caz exemplar de colaborare între autoritățile de sănătate publică, clinicieni, instituții administrative, producătorii și distribuitorii de vaccin, precum și un model al rolului mass-media, ce a inițiat un amplu program de informare a populației și a generat deschiderea a numeroase centre de vaccinare în afara spitalelor, de multe ori organizate de voluntari. Atât scenariul epidemiologic, cât și modul de mobilizare a autorităților sunt similare celor din cursul epidemiei de SARS din 2003, când un medic infectat în China continentală a călătorit în Hong Kong și a fost sursa epidemiei declanșate în mai multe țări.

Cea mai răspândită epidemie apărută după cel de-al doilea război mondial s-a petrecut în Kosovo, în 1972, într-o zonă cu dezvoltare economică foarte scăzută. Boala s-a răspândit nerecunoscută ca atare până la a doua generație de cazuri, după care s-a intervenit rapid, inițial prin vaccinarea și carantinarea contactilor și ulterior prin vaccinarea a peste 95% din populația din zonă.

Ultimul caz de variolă naturală în lume a survenit în Somalia în octombrie 1977, urmat de un caz de infecție achiziționată în laborator în Anglia, în 1978. Variola a fost eradicată. Ca rezultat al cooperării internaționale sub egida OMS, o campanie agresivă de vaccinare la nivel mondial a reușit să elimine variola în 1978-79. Eradicarea globală a variolei a fost certificată în 1980, când vaccinarea universală a fost stopată. Deși secvențierea completă a genomului virusului variolic face posibilă sinteza sa artificială (la fel ca pentru polio sau gripă), în ciuda tentativelor repetate, stocurile de virus variolic nu au fost distruse. Singurele laboratoare autorizate să mențină stocuri de virus variolic se află la CDC, Atlanta, S.U.A. și în Novosibirsk, Federația Rusă. Există însă suspiciunea că alte țări ar deține ilegal virusul și l-ar putea utiliza în scop bioterorist.

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

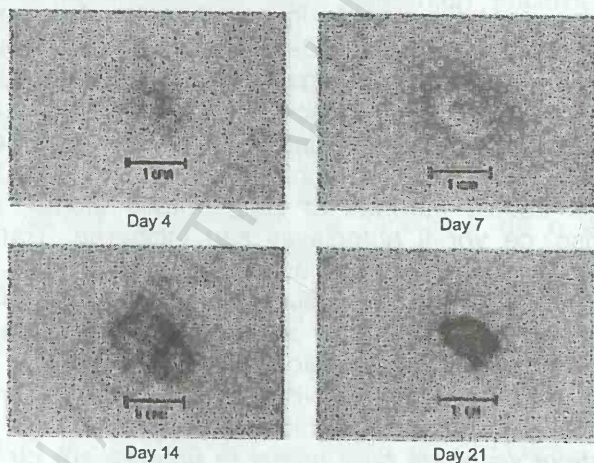
Produsele patologice de la un caz suspect de variolă trebuie recoltate doar de către personal medical vaccinat cu maxim 3 ani înaintea procedurii și echipat cu protecție adecvată (mănuși, halat, protecție pentru pantofi, mască în cazul anticipării posibilității de împrăscare cu lichid infectant). Dacă nu există personal vaccinat, recoltarea va fi făcută de personalul fără contraindicații la vaccin, echipat corespunzător și cu mască. În cazul în care se confirmă infecția variolică, cel care a recoltat va fi imediat vaccinat. După ce s-a încheiat recoltarea, întregul echipament de protecție ca și instrumentarul folosit trebuie introdus în saci ermetici închiși, etichetați cu semn de biorisc, ce vor fi autoclavați sau incinerați. Transportul produselor patologice către laboratoarele Biosafety Level 4 (BSL4 - biosecuritate nivel 4), unde se realizează diagnosticul, trebuie realizat în 6 ore la -4°C , sau în câteva zile la temperaturi de -20°C sau -70°C , respectând normele internaționale privind bioriscul. Diagnosticul de laborator se face prin izolarea virusului, prin imunofluorescență sau prin microscopie electronică în lichidul din vezicule.

Diagnosticul se poate face numai în laboratoare cu nivel maxim de biosecuritate (nivel 4). Țesutul raclat la baza veziculelor sau lichidul vezicular constituie produsul patologic examinat în scop diagnostic. Datorită dimensiunilor mari (200-400 nm) poxvirusurile sunt singurele virusuri vizibile la microscopul optic (**corpii Paschen**, pentru variolă). Electronmicroscopia constituie însă metoda de elecție care poate diferenția virionii rectangulari pox de alte virusuri care dau vezicule (varicela-zoster). În microscopia electronică virionii prezintă un miez în formă de băț de tobă cu doi corpusculi laterali, o membrană externă formată din subunități lipoproteice tubulare, cu aranjament neregulat, și o anvelopă cu numeroase proiecții grupate în "ghem de

lână". Alte metode de diagnostic rapid includ imunoelectroforeza sau imunodifuzia cu lichidul vezicular ca antigen. De asemenea, au fost sintetizate sonde moleculare pentru decelarea și identificarea virusurilor pox prin hibridarea acizilor nucleici.

În afara principalei confuzii vaccină/varicelă diagnosticul diferențial trebuie să rezolve discriminarea variolei de celelalte poxvirusuri și, în primul rând, de vaccină. Diferențierea se face pe baza proprietăților de cultivare și leziunilor produse pe membrana chorioalantoidiană, pe culturi de celule sau la animal. Boala se transmite prin contact direct sau mediat, virusul fiind foarte rezistent în crustele leziunilor vindecate. Există forme grave cu mortalitate peste 30% (variola major) și forme date de tulpini mai puțin virulente. Incubația este de 10-12 zile, iar evoluția leziunilor de la *maculă* → *papulă* → *veziculă* → *pustulă* → *cruste* durează alte 10-12 zile (fig. 31.1). Formele severe de varicelă (herpesvirus) sau infecțiile rare cu monkeypox pot fi confundate cu variola. În variolă leziunile evoluează centripet (de la extremități spre trunchi), în varicelă centrifug.

Expected smallpox vaccination-site reaction (i.e., a take)
in a first-time vaccinee, demonstrating the progression
from papule (day 4) to pustule (days 7-14), to scab (day 21)



Source: CDC.

Fig. 31.1. Evoluția leziunilor, de la *maculă* → *papulă* (ziua a 4-a) → *veziculă* (ziua a 7-a) → *pustulă* (ziua a 14-a) → *cruste* (ziua a 21-a), în urma vaccinării antivariolice urmează aceeași succesiune cu leziunile generalizate din boala naturală sau din infecția experimentală la iepure.

Virusul vaccinei a fost utilizat ca vector pentru imunizare împotriva rabiei, hepatitei B, SIDA etc., uneori ca vaccin hibrid multivalent. Un succes notabil l-a avut utilizarea vaccinului rabic grefat pe virusul vaccinal sau pe canarypox (virus pox la păsări) pentru imunizarea

animalelor sălbatice (vulpi, lupi) și limitarea endemiei de rabie silvatică în Europa.

În tabelul 31.I sunt sintetizate diferențele în proprietățile biologice ale principalelor orthopoxvirusuri care produc infecții la om.

TABELUL 31.I

PROPRIETĂȚI BIOLOGICE ALE POXVIRUSURILOR

Proprietatea	Variola	Monkeypox	Vaccina	Cowpox
Spectru gazde	îngust	larg	larg	larg
Temperatura optimă	37,5	39	41	40
Leziuni iepure	mici	hemoragice	noduli	hemoragice
Letalitate șoarece	joasă	mare	foarte mare	variabilă
Plaje pe MCA	mici, opace	mici, opace	mari	hemoragice

CLINICĂ

Variola și infecțiile cu monkeypox (care încă apar în Africa de Vest) sunt boli sistemice cu rash generalizat. Leziunile evoluează sincron, de la stadiul de maculă la papulă, veziculă, pustulă. Localizarea este atât pe mucoase, cât și pe piele, iar diseminarea este centripetă (de la extremități către trunchi). Deși variola a fost eradicată, medicul trebuie avertizat asupra tabloului clinic care poate fi mimat în zonele tropicale de monkeypox sau poate constitui expresia unor accidente sau acțiuni criminale (tabelul 31.II). Orice caz suspect se anunță prin telefon autorităților sanitare. Bolnavii sunt izolați, iar contactii vaccinați și urmăriți 16 zile. Profilaxia cu męthisazona poate fi aplicată.

Consecutiv viremiei, pielea este principalul organ țintă în variolă. În infecțiile localizate determinate de alte poxvirusuri replicarea virală este limitată la nivelul porții de intrare, sub forma unor eroziuni epiteliale. Evoluția infecțiilor localizate este reprodusă de reacția la vaccin (vaccinul este încă aplicat militarilor în anumite circumstanțe, precum și celor expuși riscului profesional).

Reacția la vaccin diferă la subiecții neimuni (reacție primară) și la cei cu o imunitate reziduală (reacție accelerată sau imediată).

Reacția primară are următoarea succesiune: papulă (primele 3-5 zile de la vaccinare); veziculă cu eritem periferic (ziua 6-7); pustulă cu limfadenită și febră (ziua 8-9). După ziua a 10-a pustulele se usucă și devin cruste care evoluează în următoarea săptămână lăsând cicatrice indelebile.

Reacția accelerată atinge maximum în zilele 3-7, fiind limitată la stadiul macular sau papular fără veziculare.

Reacția imediată apare la subiecți cu imunitate solidă și constă în răspuns de hipersensibilizare de tip papulovezicular în ziua 2-3.

TABELUL 31.II

DIAGNOSTIC CLINIC DIFERENȚIAL VARIOLĂ VERSUS VARICELĂ

Faza	Variola	Varicela
Incubație	7-17 zile	14-21 zile
Prodrom	2-4 zile	Minim/absent
Leziuni	Profunde, cu distribuție centrifugă, apar inclusiv pe palme și tălpi	Superficiale, cu distribuție centripetă, nu apar pe palme și tălpi.
Progresia leziunilor	Sincronă, cu formare de cruste la 10-14 zile de la debutul rash-ului și cu desprindere la 28 de zile de la debutul leziunilor	Asincron, cu apariție în valuri, cu evoluție rapidă în 24 de ore de la stadiul de maculă, papulă, veziculă, urmat de apariția crustelor la 4-7 zile și desprindere completă, fără cicatrice, la 14 zile după rash.

Probabil că folosirea vaccinurilor hibride grefate pe virusul vaccinal (capitolul 10) va reactualiza interesul pentru clinica reacției vaccinale și totodată pentru complicațiile posibile ale vaccinării primare. Aceste complicații pot fi: autoinoculări secundare (0,05%); vaccina generalizată (0,02%); encefalită postvaccinală (0,01%). La subiecți cu afecțiuni dermatologice cronice pot apărea *eczema vaccinatum* sau *vaccinia necrosum*. Cifrele de mortalitate asociate vaccinării trebuie cunoscute în contextul datelor privind boala naturală. Astfel, mortalitatea în variolă era de 15-30%, în variolizare 2%, iar vaccinarea primară 1 la milion.

Tratamentul complicațiilor vaccinării cuprinde administrarea imunoglobulinelor specifice (antivaccinale) și a metisazonei.

Trebuie notat că manifestările clinice ale infecției achiziționate în timpul unui atac bioterorist pot diferi de cele cunoscute pentru infecția naturală. Orice sindrom compatibil fie și parțial cu simptomatologia cunoscută pentru variolă trebuie să alerteze clinicienii. Conform definiției CDC, un singur caz suspect de variolă reprezintă o urgență majoră de sănătate publică, iar un caz confirmat este echivalent cu o epidemie.

PROFILAXIE

Succesul campaniei mondiale de eradicare a variolei se explică prin câteva particularități ale epidemiologiei acestei boli. Între acestea menționăm: stabilitatea antigenică a virusului, absența altei specii în

afara omului ca rezervor de virus, eficiența vaccinului și contagiozitatea redusă a bolii.

Totuși, decizia de a înceta vaccinarea noilor generații după 1980-82 a reprezentat un act de mare responsabilitate, care a cântărit și riscurile și avantajele vaccinării. Decizia a fost înțeleaptă, pentru că au putut fi controlate accidente izolate ulterioare, apărute în Anglia, de exemplu, prin detectarea promptă și vaccinarea contactilor. Teoretic, este posibil ca odată cu diminuarea imunității specifice la nivel populațional, alte orthopoxvirusuri să se adapteze la om și, eventual, să dobândească o patogenitate sporită. Studiile de cartografiere genomică sunt însă liniștitoare: alte poxvirusuri diferă atât de mult de virusul variolei, încât posibilitatea unei mutații către virulența ultimului este neglijabilă.

VACCINAREA ANTIVARIOLICĂ

Prima încercare de profilaxie a variolei datează din secolul al X-lea î.Ch. În China se practica prizarea pulberii realizate din cruste desprinse de la cazurile de variolă ca mijloc de protecție împotriva infecției naturale. În Turcia, conținutul pustulelor provenind de la cazuri de variolă cu forme clinice ușoare era colectat și folosit pentru imunizarea altor persoane, în speranța că și acestea vor face forme atenuate. Procedeu se numea *variolizare*, iar mortalitatea era de 1-2%. Riscul era considerabil diminuat în comparație cu mortalitatea de 25% a bolii naturale. Acest procedeu a fost importat în secolul al XVII-lea în Anglia. În 1717, după variolizarea fiului său, soția ambasadorului britanic în Turcia îi scria unei prietene din Anglia: "...variola, atât de răspândită la noi și atât de temută, este complet inofensivă aici, datorită variolizării. Am destul patriotism ca să fac tot ce-mi stă în putință ca această invenție să devină la modă și în Anglia". La 8 august 1721, șapte condamnați la moarte din Marea Britanie au fost supuși variolizării. Ei au dezvoltat forme foarte ușoare de variolă, s-au vindecat complet și au rămas protejați împotriva infecției. Drept răsplată au fost grațiați și eliberați. Deși chestionabil din punct de vedere etic, astăzi experimentul a dus la introducerea de rutină a variolizării în Marea Britanie. Variolizarea s-a practicat în Anglia până la 1800, iar în Pakistan, Etiopia și Afganistan până în 1970.

În 1796, Edward Jenner a descoperit vaccinarea utilizând o tulpină de cowpox ca imunogen. În epocă era cunoscută rezistența mulgătoarelor care contractaseră cowpox în timpul epidemiilor de variolă. Jenner a utilizat limfa vaccinală dintr-o pustulă apărută la o tânără mulgătoare (Sarah) pentru imunizarea unui copil (James Philips). Succesul acestui experiment a impus aceste nume în isto-

ria medicinei, odată cu termenul de *vaccin* și cu numele vacii (Blossom!) care a furnizat materialul vaccinal pentru alte imunizări la om. Jenner nu s-a limitat numai la administrarea vaccinului, ci a inoculat celor vaccinați virusul variolic sălbatic (procedeu ce ar ridica astăzi mari probleme de etică în cercetarea biomedicală). Toți subiecții vaccinați de Jenner au rezistat probei. Este cert că Jenner a fost favorizat de șansă: virusul folosit de el nu era cowpox, ci probabil un recombinant între cowpox și horsepox. Mult timp tulpina vaccinantă Lister a fost întreținută pe cai, pasajele interumane scăzând imunogenitatea. În România vaccinarea a fost introdusă de doctorul Polizu (medicul șef din București în 1850), iar denumirea populară era altoi.

Eradicarea variolei s-a datorat campaniei agresive de imunizare coordonată de OMS, însă câteva caracteristici proprii numai acestei infecții au favorizat succesul:

- Variola nu are rezervor animal de virus.
- Nu există cazuri subclinice, iar diagnosticul este relativ simplu.
- Nu există infecții latente sau persistente.
- Bolnavii nu sunt infecțioși în incubatie, ci numai după apariția leziunilor.
- Există un singur serotip.
- Vaccinul este totdeauna eficient când apar leziunile caracteristice vaccinale.

- Postinfecție sau postvaccinare imunitatea este persistentă.
- Gravitatea bolii a determinat acceptarea necondiționată a vaccinului, independent de riscurile și costurile asociate.

Eradicarea variolei s-a realizat prin imunizarea întregii populații susceptibile cu vaccinul antivariolic viu atenuat, preparat din limfa vaccinală provenită de la vițeii. Vaccinarea antivariolică asigură un înalt nivel imunitar protector pentru o perioadă de 3-5 ani și un grad mai redus de protecție ulterioară. Istoric, vaccinarea a fost eficientă în prevenirea variolei la 95% din persoanele imunizate. De asemenea, administrarea vaccinului în primele 3 zile postexpunere la infecția variolică a prevenit apariția bolii sau a scăzut substanțial gravitatea manifestărilor clinice ale infecției.

Vaccinul se administrează utilizând un ac bifurcat cu care se fac câteva înțepături superficiale pe o zonă circumscrisă de circa 2 cm la nivelul antebrațului. Răspunsul normal la vaccinarea primară sau la revaccinare după o perioadă lungă de timp se numește *reacție majoră sau primară*. Acesta implică dezvoltarea la 2-5 zile postvaccinare a unei papule la locul inoculării, care se transformă în 7-10 zile într-o pustulă cu dimensiuni de cca 12 mm. Răspunsul local este maxim între 8-10 zile, când pustula este înconjurată de o zonă eritematoasă, inflamată. Leziunile pot fi acompaniate de adenopatii

axilare, dureri locale și musculare generalizate și de febră (38°C) în 18% din cazuri. După 14 zile de la vaccinare apar crustele, care se desprind în jurul zilei 21. Studii recente ce utilizează diluții de vaccin arată aceeași evoluție a leziunilor. La unele persoane se observă o reacție primară robustă, sub forma unei zone largi de eritem, edem, durere și căldură la locul vaccinării. Această reacție apare către ziua 8-10 (corespunzător vârfului din reacțiile inflamatorii postvaccinale uzuale). Leziunile regresează spontan în câteva zile. Între 5-15% din recipienții vaccinurilor administrate recent au prezentat astfel de reacții primare robuste, uneori acompaniate de limfangită și leziuni satelite.

Vaccinarea antivariolică este grevată de o serie de reacții adverse de gravitate variabilă. Cea mai frecventă este *inocularea necorespunzătoare*, care se referă la transferul accidental de la locul inoculării la altă regiune a corpului sau la altă persoană și duce la apariția unor leziuni similare celor descrise la reacția primară. Regiunile implicate sunt fața, pleoapele, nasul, gura și mucoasa genitală. Igiena riguroasă a regiunii afectate este o măsură terapeutică suficientă, ce poate fi suplimentată în cazuri severe de administrare de imunoglobuline antivaccinia (VIG).

Eczema vaccinatum este o complicație severă a vaccinării antivariolice, ce apare în special la persoane cu eczeme active sau dermatite atipice sau cu aceste boli în antecedente, precum și la cei cu arsuri sau psoriazis activ. Cele mai grave forme au fost raportate la contacți ai indivizilor recent vaccinați, unde poate evolua letal. Leziunile sunt veziculo-pustuloase și au tendința să devină confluențe, apărând mai ales în teritoriul cutanat afectat anterior. Vindecarea se produce cu cicatrice sau depigmentări. Această complicație apare datorită răspândirii hematogene a virusului, iar leziunile conțin virus vaccinia viu. Pacienților trebuie să li se asigure aport hidric adecvat; tratament suportiv și să li se administreze VIG. Leziunile conțin virus vaccinia viu ce poate fi transmis prin hainele și lenjeria pacientului. Transmiterea nozocomială trebuie limitată prin respectarea strictă a precauțiilor de contact.

Vaccinia generalizată se prezintă sub formă de rash vezicular sau pustular, apărut distal față de locul inoculării, acompaniat de febră și alte manifestări sistemice. La o persoană imunocompetentă, vaccinia generalizată este obișnuit autolimitantă și nu necesită terapie specifică. VIG se pot utiliza în cazurile severe.

Vaccinia progresivă (necrosum) este o reacție adversă rară, de extremă severitate, ce apare la persoane cu imunitate celulară sau umorală scăzută (în mod particular la cei cu neoplasme hematologice, hipogammaglobulinemie sau deficiențe în imunitatea celulară). În aceste cazuri, leziunile de la locul vaccinării nu se vindecă, devin ulcerative, apoi necrozante și se extind, fără a fi acompaniate de inflamații. Leziunile conțin virus viu, astfel încât precauțiile privind li-

mitarea transmiterii prin contact trebuie riguros respectate. Această complicație a fost tratată cu doze agresive de VIG și câteodată cu debridarea chirurgicală a țesutului necrozat.

O altă complicație rară, dar extrem de severă este *encefalita postvaccinare*. Aceasta apare mai frecvent la copii vaccinați sub 1 an dar și la adolescenți sau adulți la primo-vaccinare. Este letală în 15-25% din cazuri și determină sechele neurologice în 25% de cazuri. Simptomele variază de la diferite grade de confuzie la convulsii și comă și apar între zilele 9-14 postvaccinare. Nu s-a demonstrat prezența virusului în SNC. Tratamentul este suportiv, anticonvulsivant. Encefalita nu răspunde la administrare de imunoglobuline antivaccinia.

Vaccinia fetală este o complicație rară, ce apare după primo-vaccinarea unei femei gravide în trimestrul II sau III de sarcină, prin diseminarea hematogenă a virusului în lichid amniotic sau direct la făt. Există doar 50 de cazuri raportate în literatură. Studiile privind avortul spontan postinfecție în trimestrul I de sarcină sunt controversate. În majoritatea cazurilor de vaccinia fetală se produce moartea fătului in utero.

Tratamentul primar al reacțiilor adverse ce implică replicarea virală activă și diseminarea este administrarea de VIG - imunoglobuline umane specifice antivaccinia derivate din plasma persoanelor vaccinate. Acest preparat este eficient în tratamentul eczema vaccinatam, vaccinia generalizată severă și a determinărilor oculare postinoculare necorespunzătoare.

Ținând cont de reacțiile adverse menționate, contraindicațiile vaccinării antivariolice sunt numeroase:

- persoane cu eczemă, dermatită atopică sau alte afecțiuni dermatologice exfoliative;
- pacienți cu leucemii, limfoame și alte afecțiuni maligne generalizate care primesc agenți alchilanți, antimetaboliți, corticosteroizi în doze înalte sau tratament cu radiații;
- pacienți HIV pozitivi;
- pacienți cu deficiențe imune ereditare;
- femeile gravide și cele care alăptează, de asemenea, femeile care intenționează să rămână gravide în decurs de 4 săptămâni de la vaccinare.

Dacă persoanele cuprinse în aceste grupe de risc vin în contact cu un pacient suspect de variolă sau dacă exercită profesii cu risc pentru achiziția variolei, se indică vaccinare asociată cu administrarea de VIG în doză de 0,3 ml/kg corp pentru prevenirea complicațiilor. Numărul reacțiilor adverse în cazul reluării vaccinării antivariolice poate fi ridicat, mai ales datorită numărului mare de persoane imunosupresate și al celor cu dermatite atopice sau eczemă.

Opțiunea privind reintroducerea vaccinării trebuie să ia în calcul două aspecte esențiale:

- siguranța administrării vaccinului viu atenuat;
- transmisibilitatea virusului vaccinia de la o persoană recent vaccinată la o gazdă susceptibilă.

În ceea ce privește siguranța administrării vaccinului viu atenuat, datele provenite din studii realizate anterior eradicării variolei arată că la un milion de persoane vaccinate, aproximativ 1 000 prezintă reacții adverse severe, dar fără risc vital (de tip eritem multiform sau inoculare necorespunzătoare); între 14-52 de persoane dezvoltă reacții adverse cu risc vital (vaccinia generalizată, encefalită postvaccinală) și 1-2 persoane decedază ca urmare a complicațiilor asociate vaccinării.

Sinteză

Morfologia virionului vaccinal este în formă de căramidă. Talie mare: 270 x 350 nm (vizibil la microscopul optic), anvelopat + membrane externe, numeroase enzime în centrul virionului.

Genomul este ADNds, linear, nesegmentat, polaritate pozitivă; 186-192 kb, 200 de cadre de citire.

Situl replicării: citosol. Transcriptaza - virală: polimeraza ADN dependentă de ADN. Replicaza - virală - ADN dependentă de ADN. Intermediar replicativ: ADN concatemic legat cap la cap cu alt genom vaccinal. Asamblare în citoplasmă. Eliberare consecutivă citolizei celulelor infectate sau exocitozei. Toate enzimele necesare replicării sunt virale, iar virusul se replică și în celule enucleate.

Boli asociate: variola: incubatie 10-14 zile, debut acut al febrei, rash după 3-4 zile, mortalitate <10% = *variola minor* sau >30% = *variola major*.

Monkeypox: debut și evoluție similară variolei, dar cu mortalitate mică.

Orf: dermtita pustulară contagioasă.

BIBLIOGRAFIE

- Fenner F. Ultimul caz endemic de variolă. Smallpox and its eradication 1977. WHO, Geneva.
- Goebel SJ et al. Genomul secvențiat complet al virusului vaccinal. Virology 1990;179:247-266.
- MAssung R et al. Genomul secvențiat complet al virusului variola. Virology 1994;201:215-240.
- Drazen JM. Smallpox and Bioterrorism. N. Engl. J. Med. 2002;346:1262-1263.

VIROZE EMERGENTE

De reținut:

Cauzele apariției unui nou sindrom infecțios sau a unui număr disproporționat de mare de cazuri de îmbolnăviri cu aspect clinic surprinzător pentru un anumit areal pot fi:

- un agent etiologic ce reprezintă o mutantă cu virulență crescută a unui patogen comun (exemplu recent: tulpini înalt patogene de gripă aviară);

- un recombinant al unui microorganism ce a infectat aceeași populație, dar este asociat unui alt profil patogenic (tulpini pandemice de gripă umană);

- un agent etiologic "nou" - un virus introdus deliberat într-o populație susceptibilă (într-un scenariu pesimist - bioterorism cu virusul variolic);

- un microorganism ce devine patogen prin depășirea barierei de specie animal → om (exemplu: gripa aviară).

Exemplele recente de posibile pandemii determinate de virusuri emergente sunt: sindromul respirator acut sever (SARS) în 2003 și gripa aviară în 2004-2007.

La începutul secolului al XXI-lea, un sfert din totalul deceselor este datorat bolilor infecțioase care afectează în mai mare măsură țările în curs de dezvoltare și, în particular, copiii. Alături de infecțiile diseminate deliberat (microorganisme și toxine cu potențial bioterorist), una din cele mai importante probleme de sănătate publică este reprezentată de cele două categorii de boli infecțioase emergente:

- sindroame a căror incidență a crescut în ultimele două decade, determinând, neașteptat, epidemii de amploare. Majoritatea acestora sunt zoonoze - termenul presupunând fie transmiterea incidentală a unor agenți etiologici de la animal la om (cu sau fără vectori interpuși), fie cazul, mai grav, al agenților etiologici ce trec bariera de specie;

- sindroame reemergente, boli anterior controlate prin vaccinare sau chimioterapie și care revin în actualitate datorită modificărilor fac-

torilor de mediu sau selecției unor mutante virale rezistente la medicamentele uzuale (malaria, tuberculoza, SIDA).

NOI INFECȚII EMERGENTE TRANSMISE DE LA ANIMAL LA OM

Explicațiile apariției virozelor emergente sunt complexe, incluzând variabilitatea virală, schimbări demografice, sociale și comportamentale ce țin de gazdă, perturbarea echilibrului ecologic și perfecționarea metodelor de diagnostic. Modificarea continuă sau brutală a unor factori de mediu, dar și schimbările comportamentului uman (migrația, urbanizarea, tranziția) creează oportunități imprevizibile pentru adaptarea unor virusuri la nișe ecologice noi. Nivelul imunității specifice în populația țintă este practic nul, astfel încât izbucnirile epidemice sunt explicabile. În plus, aspectul clinic al îmbolnăvirilor diferă de ceea ce se cunoaște din descrierea cazurilor apărute în nișa ecologică naturală.

Epidemii de gravitate deosebită au fost semnalate în ultimul deceniu cu agenți transmiși de la animale la om (febra Ebola, gripa aviară, SARS), cu sau fără intervenția unor vectori. Potențialul lor de diseminare, consecință a globalizării, a alertat atât Organizația Mondială a Sănătății, cât și autoritățile naționale de medicină preventivă. Scenarii diferite sunt propuse pentru a evita apariția unor situații imprevizibile, care ar putea dezechilibra economic și social largi comunități umane.

Creșterea animalelor în mediu urban sau semiurban, vânatul și turismul în teritorii exotice sunt numai câteva exemple de intervenții umane care au facilitat apariția unor focare epidemice. Dintre agenții incriminați notăm, în primul rând, pe cei transmiși de vectori (insecte, rozătoare). De o gravitate deosebită sunt febrele hemoragice cu arenavirusuri (Lassa, febrele hemoragice din America de Sud) și sindromul pulmonar cu hantavirus (HPS). Proliferarea rozătoarelor și invadarea locuințelor rurale/urbane favorizează infecțiile umane.

Virusurile din grupul serologic St. Louis, West Nile și encefalita japoneză dau cel mai frecvent meningoencefalite. Formele neurologice severe sunt frecvente la bătrâni, unde letalitatea poate ajunge la 10%. O caracteristică importantă a virusurilor din grupul antigenic West Nile este menținerea într-un ciclu natural de transmitere, ce implică păsările, ca gazde amplificatoare, și țânțarii, ca vectori. Pentru aceste virusuri, omul (și uneori calul) sunt gazde ocazionale, de la care transmiterea virală nu mai este posibilă. Virusul West Nile a determinat izbucniri epidemice recente în Algeria, 1994 (50 de cazuri, cu 2 decese); România, 1996 (aproximativ 500 de cazuri, 17 decese); Tunisia, 1997 (173 de cazuri, 8 decese); Rusia, 1999 (318 cazuri,

40 de decese); S.U.A., 1999 (62 de cazuri, 7 decese), Israel, 2000 (417 cazuri, 35 de decese); din nou Rusia, 2001 (64 de cazuri, 4 decese). În cazul României, s-a semnalat pentru prima oară prevalența urbană a cazurilor în orașe cu probleme în canalizare și în evacuarea deșeurilor menajere.

O explicație a epidemiei din România a fost importul țânțarilor viruliferi odată cu importul de fructe și flori exotice. Aceste insecte găsesc spații convenabile de înmulțire în containerele în care sunt depozitate fructele și pot reprezenta surse și pentru alte virusuri neobișnuite pentru zona noastră geografică. Am asistat în acest caz la ceea ce s-a numit vectorizarea vectorilor.

Măsurile de control adoptate constau în folosirea pe scară largă a insecticidelor remanente, salubritatea arealelor de pontă pentru insecte și educația publicului privind pericolul reprezentat de rezervorul animal de virus, ca și de insectele vectoare.

Infecții emergente transmise omului de la animal au apărut și în absența vectorilor. Cele mai cunoscute exemple sunt:

- izolarea paramixovirusului Hendra în 1994 în Australia. Virusul Hendra a afectat numai câțiva pacienți la început, toți fiind în contact direct cu cai de rasă;

- epidemia de encefalită din 1997-1998 din Malaezia cu noul paramixovirus Nipah (numit după orașul unde a fost izolat), apărută în condițiile creșterii industriale a porcilor.

Virusul Nipah și virusul Hendra diferă în secvența de aminoacizi în proporție de numai 10% în raport cu alte paramixovirusuri (virusul rujeolei sau al jigodiei canine). Virusul Nipah a fost izolat din lichid cefalorahidian, iar toți pacienții decedați au dezvoltat un răspuns imun caracterizat prin prezența anticorpilor IgM, crossreactivi cu virusul Hendra. În 1999 cazuri similare au apărut în Singapore, la lucrătorii din abatoarele ce procesau porci importați din Malaezia (258 de cazuri de encefalită virală, cu o rată de fatalitate de aproximativ 40%). Majoritatea cazurilor au survenit la adulți care au avut contact direct cu porcii cu infecție simptomatică, fără cazuri secundare. De menționat că majoritatea persoanelor care au dezvoltat encefalită erau imunizate împotriva virusului encefalitei japoneze, endemic în regiune.

Tot intervenția omului în zootehnie a facilitat epidemia cu noua variantă a bolii Creutzfeld Jakob (nvCJ). Suplimentarea hranei bovinelor cu concentrat proteic provenit din făina de oase rezultată din carcasele oilor bolnave de scrapie a determinat infectarea lor cu prioni și a declanșat epidemia de encefalopatie spongiformă bovină (ESB - boala vacii nebune, *mad cow disease*). Ingestia cărnii, creierului și viscerelor de la bovine a permis o nouă traversare a barierei de specie, cu apariția unei encefalopatii spongiforme - nvCJD - la om. Surprinzător, prionii nvCJ au un spectru de gazdă extins și la alte rumegătoare, ceea ce impune o supraveghere veterinară atentă și la oi, capre, elani etc.

Un exemplu sugestiv pentru evoluția unei viroze emergente în condițiile globalizării, urbanizării excesive, cu supraaglomerări populaționale și viteză mare de deplasare este pandemia SARS din 2003 (vezi capitolul Coronavirusuri).

VIRUSURILE FEBRELOR HEMORAGICE (VFH)

VFH sunt virusuri emergente, provenite din nișe ecologice mai puțin explorate de om, agenți ce pot determina epidemii de amploare și neașteptate. Patru familii virale, taxonomic distincte, sunt implicate în etiologia febrilor virale hemoragice: bunya- și flavivirusurile (vezi capitolul arbovirusuri), filo- și arenavirusurile.

Patogenii emergenți semnificativi din familia filoviridae sunt virusurile Ebola și Marburg, iar dintre arenaviridae: virusul Lassa și arenavirusurile noi: virusul Machupo (*febra hemoragică boliviană*), virusul Junin (*febra hemoragică argentiniană*), virusul Guanarito (*febra hemoragică venezueleană*), virusul Sabia (*febra hemoragică braziliană*), virusul Whitewater Arroyo etc.

Virusurile febrilor hemoragice sunt încadrate de CDC (*US Center of Diseases Control and Prevention*) ca agenți cu risc bioterorist maxim (clasa A), deoarece se pot răspândi prin aerosoli; sunt infecțioase la titru scăzut; determină morbiditate și mortalitate crescută și nu beneficiază de tratamente sau mijloace de profilaxie eficiente.

Conform definiției de caz formulate de OMS, un caz suspect de febră hemoragică virală prezintă:

- febră peste 38,3°C, cu durată mai mică de 3 săptămâni,
- stare generală sever alterată,
- cel puțin 2 din următoarele manifestări hemoragice: rash hemoragic sau purpură, epistaxis, hematemeză, hemoptizie, scaune sanguinolente,
- absența factorilor predispozanți pentru diateza hemoragică.

Spre deosebire de infecția naturală cu virusurile febrilor hemoragice, în cazul unui eveniment bioterorist apar îmbolnăviri multiple simultane, iar pacienții nu au în antecedente călătorii în zona endemică, contacte cu animale bolnave sau cu persoane infectate. Toate cazurile suspecte trebuie imediat raportate autorităților de sănătate publică.

Există o serie de rapoarte ce sugerează că atât fosta Uniune Sovietică, cât și Statele Unite au tentat transformarea virusurilor febrilor hemoragice în arme biologice, prin adaptarea lor la producție pe scară largă și transmitere prin aerosoli. Cercetări în acest sens, din fericire eșuate, a întreprins și secta teroristă Aum Shinrikyo, responsabilă de atacul cu gaz sarin din metroul din Tokio.

NEUROINFECȚII VIRALE

Un număr îngrijorător de neuroinfecții cu virusuri noi sau cu virusuri cu potențial patogenic distinct față de cel cunoscut anterior se înregistrează în Asia de Sud-Est. Astfel, în 1997, în Sibiu, Malaezia, a fost raportată o epidemie de meningoencefalită datorată unei infecții concomitente cu enterovirusul 71 și adenovirusuri din grupul B. Au fost înregistrate zeci de decese la copiii între 5 luni și 7 ani. Două alte mari izbucniri epidemice cu enterovirus 71 sunt cunoscute în regiunea țării noastre: 1975 - Bulgaria, și 1978 - Ungaria. Un episod similar a fost înregistrat în Taiwan, unde între martie și decembrie 1998 s-au raportat 130 000 de cazuri de febră aftoasă like (enterovirus), ceea ce reprezintă probabil sub 10% din numărul real de infecții. Foarte multe cazuri au prezentat complicații de tip encefalită, meningită aseptică, paralizii acute flasce și miocardită. Epidemia, cu rată înaltă de fatalitate, a fost determinată tot de enterovirusul 71. Curba de distribuție a cazurilor în epidemia din Taiwan a sugerat transmiterea respiratorie și nu fecal-orală. Cu toate că majoritatea infecțiilor produse de acest enterovirus sunt sporadice și autolimitante, trebuie reținute potențialul epidemic și gradul înalt de letalitate asociat unor epidemii. Nu este de neglijat ipoteza asocierii mai multor agenți etiologici care își potențează virulența. Studiile întreprinse au arătat că cel puțin încă un enterovirus - Coxsackie A16 - a fost activ în timpul epidemiei.

După epidemia de meningoencefalită determinată de virusul West Nile în București și în județele limitrofe în 1996, România s-a confruntat cu o epidemie de meningită enterovirală în sezonul estival 1999. Aceasta a debutat în județele din Nordul Moldovei, unde până în toamnă au fost înregistrate peste 4 000 de cazuri, în special la copii și tineri. Agentul izolat a fost enterovirusul ECHO 30.

În Vietnam a fost raportat un număr crescut de cazuri de paralizii flasce acute ce mimează poliomielita cauzate de virusul encefalitei japoneze din familia flaviridae.

În cadrul CDC Atlanta există o divizie - *Epidemic Intelligence Service* - ce investighează orice epidemie de cauză necunoscută ce poate fi atribuită eliberării deliberate a unor agenți infecțioși. În 1984, în Oregon, un grup religios a contaminat deliberat salatele dintr-un restaurant cu *Salmonella enterica typhimurium*, generând 751 de cazuri de gastroenterită cu simptomatologie severă. În 1996, în Texas au apărut cazuri de boală diareică acută la personalul unui spital care a mâncat produse de patiserie lăsate de un necunoscut în sala de mese. Agentul incriminat a fost o tulpină virulentă de *Shigella dysenteriae* tip 2, provenită chiar din laboratorul spitalului. În afara acestor cazuri confirmate, au existat în 1998 și o serie de alarme false privind posibile contaminări cu spori de antrax ale sistemelor de ven-

tilație din clădiri publice. Din nefericire, acestea au fost urmate de atacurile reale determinate de scrisori contaminate cu spori de antrax înregistrate în 2001 în Statele Unite.

INFECȚII REEMERGENTE

Infecțiile reemergente sunt determinate de agenți binecunoscuți și în trecut, dar care au căpătat o răspândire pandemică datorită absenței vaccinurilor, dezvoltării de tulpini multirezistente la antivirale sau la antibiotice, expansiunii unor grupe de pacienți imunodeficienți sau defavorizați. Principalele boli asociate sărăciei sunt astfel de infecții reemergente: SIDA, poliomiелita, tuberculoza, malaria.

SIDA. A afectat peste 60 milioane de subiecți după 1985, când diagnosticul a putut fi confirmat serologic. Înainte de a infecta omul, tulpini HIV 1 și HIV 2 erau endemice la diferite specii de primat nonhominoide. Originar din Africa Centrală, HIV 1 provine de la o specie de cimpanzeu - *Pan troglodites troglodites*, iar HIV 2, răspândit mai cu seamă în Africa de Vest, de la maimuța africană sooty mangabey, care este și gazda naturală a virusului imunodeficienței simiene (SIV). Probabil că depășirea barierei de specie primat → om a survenit cu cel puțin 60-70 de ani în urmă. Omologia genomică între SIV și HIV 2 este de 80%, în timp ce între HIV 1 și SIV numai de 50%. Astfel, tulpinile HIV 1, mai distanțate genomic de precursorul simian, sunt mai virulente pentru om decât pentru maimuțe. Oricum, atât virusurile umane, cât și cele simiene par a avea un precursor comun. Recent, în Coasta de Fildeș au fost descoperite forme de trecere SIV → HIV ce dau la om infecții asimptomatice. Aceste tulpini provin de la populația rurală, situată în afara grupelor de risc pentru achiziția infecției HIV, ceea ce ar argumenta continua contaminare a omului cu tulpini simiene. Transmiterea interumană a fost favorizată de promiscuitatea sexuală, de slăbirea structurilor familiale, de o serie de practici medicale parenterale, inclusiv transfuzii nesecurizate.

Poliomiелita. La începutul anului 2004 rămăneau trei rezervoare de virus poliomiелitic: India, Pakistan și Nigeria. Programul mondial de eradicare a poliomiелitei a fost bulversat de epidemia cu virusul polio sălbatic de tip 1 și 3 din 2004 din Nigeria, țară care înainte de 2000 realizase mari progrese în controlul diseminării poliomiелitei. În prima săptămână din 2004, în Nigeria au fost raportate peste 300 de cazuri de poliomiелită, datorate întreruperii vaccinării în regiunile din nordul țării. După cum era previzibil, cazuri noi au fost diagnosticate și în țările vecine: Burkina Faso, Ciad, Ghana și Togo. Anumite învățăminte pot rezulta din eșecul nigerian. În primul rând, urmările catastrofale ale interferenței politicului în programele sanitare și

folosirea nerealizărilor ca armă electorală. În al doilea rând, lipsa de educație care a facilitat răspândirea celor mai rău intenționate zvonuri: vaccinul este contaminat cu HIV (!) sau vaccinul are efect sterilizant (!!). În fine, slaba calitate a serviciilor publice de sănătate și pregătirea precară a personalului au compromis atât eforturile naționale, cât și contribuțiile sponsorilor externi.

BIBLIOGRAFIE

Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. Clin. Microbiol. Rev. 1994;7:89-116.

Cernescu C, Nedelcu NI, Tardei G, Ruta S, Tsai TF. Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. J. Infect. Dis. 2000;181(2):710-2.

Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. Lancet 1998;352:767-71.

BOLI PRIONICE

De reținut:

Encefalopatiile spongiforme transmisibile (EST) sunt afecțiuni neurodegenerative diagnosticate la o serie de specii de mamifere, inclusiv la om, pe baza unor criterii anatomopatologice și clinice. Particularitățile fizico-chimice ale prionilor contribuie la delimitarea acestor agenți de virusuri. Prionii sunt extrem de rezistenți la procedurile clasice de dezinfecție și sterilizare, bolile determinate sunt dificil de diagnosticat precoce și imposibil de tratat. Bolile prionice umane cele mai frecvente sunt: boala Creutzfeldt Jakob (CJD), adesea iatrogenă, rareori familială, și noua variantă CJD transmisă de la vacile bolnave de "boala vacii nebune" (nvCJ).

DEFINIȚII

Termenul de prion înseamnă proteină infecțioasă și este asociat etiologiei encefalopatiilor spongiforme transmisibile (**EST**). EST sunt afecțiuni neurodegenerative diagnosticate la o serie de specii de mamifere pe baza unor criterii anatomopatologice și clinice. Diagnosticul anatomopatologic confirmă, din nefericire, numai post-mortem, suspiciunea clinică. Criteriile morfologice de validare includ: vacuolizarea structurilor corticale (encefalopatia spongiformă), acumularea unor depozite proteice numite plăci și absența infiltratului inflamator. Natura fizico-chimică a prionilor este bine precizată. Opinia dominantă a virusologilor este că avem de-a face cu o proteină care poate exista în cel puțin două variante conformaționale:

- PrP^c (proteina prionică celulară normală) inclusă în membrana neuronilor dar și a unor celule limfoide și
- PrP^{Sc} sau PrP^{Rez} (proteina prionică scrapie sau rezistentă la digestie enzimatică) - proteină patologică care prevalează în creierul animalelor bolnave.

BAZELE MOLECULARE ALE PATOGENIEI BOLILOR PRIONICE

Ignorând acizii nucleici, considerați indispensabili pentru replicare și pentru transmiterea caracterelor ereditare, replicarea proteinelor pare imposibilă. Totuși, o reprezentare intuitivă explică acest mecanism. El corespunde "principiului dominoului" cunoscut din showurile asiatice (fig. 33.1). Presupunem că multiple copii ale PrP^c se găsesc ordonate în membrana funcțională a neuronilor. Inserția unei singure copii modificate conformațional - PrP^{Rez} - implică conversia (sau dărâmarea) tuturor copiilor funcționale și "vitrificarea" membranei neuronale, care devine incapabilă de-a conduce influxul nervos. Plăcile amiloide amintite mai sus reprezintă suportul morfologic al acestei interpretări. Susceptibilitatea genetică este un element important în frecvența bolii. Majoritatea cazurilor au fost descrise la subiecții homozigoți pentru codonul metionină (Met/Met) la poziția aminoacidului 129 al PrP^c .

Două modele sunt curent discutate pentru a explica auto-propagarea proteinelor prionice:

- Modelul transformării conformaționale presupune că, în condiții normale, un prag energetic înalt împiedică trecerea spontană a $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Rez}}$. În momentul introducerii exogene a PrP^{Rez} acest prag scade și transformarea menționată se propagă în dâră de "praf de pușcă".

- Modelul nucleației admite că cele două variante conformaționale sunt într-un echilibru termodinamic reversibil. Numai "însămânțarea" membranei neuronale cu câteva copii suplimentare PrP^{Rez} , recrutate într-o anumită ordine, într-o placă de amiloid, poate determina vitrificarea membranei neuronale propagată centrifug. Propagarea centrifugă explică aparenta replicare a agentului și admite și posibilitatea transformării spontane care survine în cazurile de boală Creutzfeldt Jakob (CJD) sporadică.

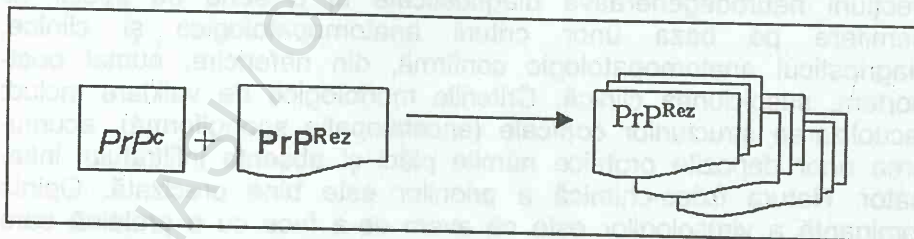


Fig. 33.1. Principiul dominoului. Inserția unei singure copii a proteinei prionice rezistente (PrP^{Rez}) determină modificarea în cascadă a tuturor proteinelor prionice celulare normale.

PrP normală este exprimată pe membrana celulară în multe țesuturi. Cele mai mari concentrații sunt în SNC, în special în zona

membranelor sinaptice, și în țesutul limforeticular. PrP^C are două segmente, ambele de aproximativ 100 de aminoacizi:

- segment transmembranar fixat cu o ancoră glicolipidică și
- segment superficial (C-terminal) cu conformație de alfa-helix și stabilizat cu o legătură disulfidică.

Șoarecii knock out pentru PrP^C nu prezintă anomalii majore, ci numai modificări ale ritmului circadian și disfuncții sinaptice. Totuși, acești șoareci sunt rezistenți la inocularea suspensiilor cu conținut prionic. S-a sugerat că PrP^C este receptorul unui ligand extracelular neidentificat încă.

Introducerea unei mutații caracteristice bolii Gerstmann-Sträussler în transgena PrP^C la șoarece determină degenerarea SNC cu vacuolizare și formarea de plăci amiloide.

Aspectul cel mai spectaculos legat de transmiterea prionilor între specii este identificarea factorilor care contribuie la depășirea "barierei de specie". O ipoteză sugerează că bariera de specie este depășită în cazul suprapunerii conformaționale între PrP^{Sc} a speciei donatoare și primitoare. Publicarea recentă a schiței genomului uman a confirmat existența unor unități structurale proteice numite domenii care sunt conservate în cursul evoluției eucariotelor. Nu mai puțin de 43% din proteinele *Saccharomyces cerevisiae* și 61% din proteinele *Drosophila melanogaster* au similarități de secvență cu proteinele umane. Absolut surprinzătoare a fost descoperirea unor analogi prionici în proteinele *Saccharomyces cerevisiae*. Aceste proteine corespond definiției moleculare a prionilor, în sensul că ele își pot propaga forma conformațională la perechile lor normale într-o manieră "infectioasă" sau autoreplicativă. Mai mult, cu proteinele prionice de levură s-a realizat experimentul decisiv: conversia in vitro, prin manipulare într-un mediu noncelular, a proteinei prionice necontagioase în varianta conformațională transmisibilă. În același model experimental s-a elucidat și un mecanism patogenic cu totul nou, prin care conversia prionică alterează celula. Proteinele prionice transmisibile aduc celula într-o stare de "infidelitate a traducerii", adică permit ribozomilor care sintetizează de novo proteinele pe matrița ARNm să continue traducerea ignorând codonii stop.

DEGENERAREA SNC ÎN BOLILE PRIONICE

Problema centrală pentru înțelegerea simptomatologiei EST, la om sau animal, este răspunsul la întrebarea dacă acumularea intra-neuronală a PrP^{Rez} este suficientă pentru compromiterea transmiterii influxului nervos sau pentru pierderea neuronală.

Experimente pe șoareci transgenici deficienți în PrP^C au arătat că ei sunt rezistenți la infecția prionică. Dacă acești șoareci sunt grețați cu neuroni care exprimă PrP^C și sunt ulterior infectați, se obțin pierderi neuronale și glioză (astrocitoză reactivă) numai în zonele grețate. Aceste observații au permis conturarea unei ipoteze patogenice care poate servi ca punct de plecare pentru dezvoltarea unor principii terapeutice.

Procesul conversiei PrP^C în PrP^{Rez} induce neurodegenerarea, probabil prin formarea unor areale modificate în membrana neuronală. S-a sugerat că în aceste areale se aglomerează molecule de PrP^{Rez} așezate într-o manieră ordonată, care le permite ancorarea definitivă la membrană, determină imposibilitatea detașării și acumularea în timp (ceea ce corespunde simptomatologiei progresiv ireversibile). De subliniat că termenul introdus de Rudolf Virchow cu un secol în urmă - proteine amiloide - se suprapune conceptului de mai sus. Potrivit lui Virchow, plăcile amiloide conțin proteine care sunt birefringente în lumină polarizată când sunt colorate cu roșu de Congo. Astăzi definim aceste plăci ca proteine care ating nivelul minim de energie liberă în momentul în care agregă într-o manieră ordonată.

BOLI PRIONICE UMANE

Encefalopatiile transmisibile umane se disting de cele descrise la animale prin existența a trei forme de prezentare: familială, sporadică și transmisibilă (tabelul 33.I). Etiologia prionică a fost argumentată în toate cazurile, iar posibilitatea transmiterii encefalopatiei spongiforme de la bovine la om a condus la delimitarea *noii variante a bolii Creutzfeldt Jakob (nvCJ)*.

Bolile prionice (tabelul 33.I) implică transformarea proteinei prionice normale PrP^C în forma proteazo-rezistentă PrP^{Sc} (de la scrapie). Izoforma patologică este alcătuită mai ales din file beta, iar cea normală din alfa-helixuri. Un mecanism posibil pentru propagarea prionilor este inițierea transformării PrP^C → PrP^{Sc} care se produce diferit în:

- formele familiale → printr-o mutație patogenă;
- formele sporadice → prin conversie spontană către file beta;
- formele transmisibile → printr-un fenomen de nucleație conștând în agregarea PrP^C în jurul unei molecule PrP^{Sc} cu schimbarea conformației moleculare.

TABELUL 33.1

BOLI PRIONICE LA ANIMAL ȘI OM

<i>Boli prionice la animal</i>
Scrapie la oi. Encefalopatia spongiformă bovină (boala vacii nebune - <i>mad cow disease</i> sau BSE). Encefalopatii transmisibile spongiforme la ovine și caprine (TSE). Encefalopatii transmisibile la feline, la elani, la nurci etc.
<i>Boli prionice umane</i>
Boala Creutzfeldt Jakob (CJD) sporadică (adesea iatrogenă, rareori familială). Noua variantă CJ transmisă de la vacile bolnave de <i>mad cow disease</i> (nvCJ). Boala Gerstmann-Sträussler-Scheinker (ataxie progresivă familială și demență). Insomnia fatală familială. Boala kuru (endemică în anii '60 în Papua - Noua Guinee).

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

Metodologia detecției prionilor în nvCJ a adus următoarele precizări:

1. Toate cazurile nvCJ au fost găsite la subiecți homozigoți Met/Met la codonul 129 al genei pentru proteina prionică (la fel ca în populația afectată de kuru, patru decade anterior !).

2. Testele Western blot (Prionics®) sau ELISA au 100% sensibilitate și specificitate.

3. Testele imunohistochimice prezintă o sensibilitate și specificitate inferioare, în funcție de proprietățile anticorpilor monoclonali. Mulți dintre monoclonali reacționează atât cu PrP^C, cât și cu PrP^{Sc}. Un protocol care indică pretratarea lamelor cu acid formic, tiocianat de guanidină și autoclavare, crește specificitatea imunohistochimiei. Există profiluri de colorare progresivă în funcție de stadiul bolii:

- colorare difuză de tip sinaptic (timpuriu),
- colorare perivacuolară a depozitelor fibrilare (intermediar) și
- colorare densă a plăcilor (tardiv).

Testele rapide sunt comparabile cu rezultatele examenului histologic, imunohistochimic sau cu evaluarea infectivității la șoarece.

La om există date cantitative privind concentrația prionilor la bolnavi cu nvCJ: 5,1 ID₅₀/mg țesut cerebral; 10³ ID₅₀/mg țesut splenic. În alte țesuturi: nervi periferici, plămân, pancreas, rinichi etc. concentrația este limitată de pragul de detecție al metodei biologice (inoculare la șoarece) cu care au fost obținute valorile menționate.

Un aspect revelator pentru transmiterea iatrogenă este infectivitatea globului ocular. Pe modelul hamster infectat cu scrapie, infectivitatea retinei și a nervului optic sunt similare cu cea a creierului (10⁵ ID₅₀). Concentrația în corneă și cristalin a fost cu trei ordine de mărime inferioară.

Studiul polimorfismului proteinelor prionice la om a condus nu numai la stabilirea codonului care diferențiază proteina celulară normală de cea implicată în geneza nvCJ (codonul 129: Met/Val), ci și la găsirea unei alte mutații, de această dată cu rol protector asupra transformării PrP^C în PrP^{Sc}: codonul 219 Glu/Lys. Pacienții homozigoți 129 Met/Met au risc mare de dezvoltare a nvCJ; acest risc este diminuat de homozigotismul 219 Lys/Lys.

Cazurile de CJD se clasifică în posibile, probabile și definitive (confirmate) în raport cu argumentele clinice, de laborator și anatomicopatologice ce susțin diagnosticul. Indiferent de situație, orice caz suspect sesizat de neurolog trebuie confirmat de un alt neurolog cu pregătire specifică, care investighează și factorii de risc care pot fi incriminați în infecție și/sau diseminarea ei secundară. Aceste informații trebuie transmise și autorităților de sănătate publică. În general, trebuie cunoscute: identitatea pacientului, tipul de CJD, debutul și alte date clinice, istoricul procedurilor invazive: medicale, chirurgicale, stomatologice aplicate bolnavului. De notat că în baza de date rămân și cazurile suspecte (CJD sporadică sau noua variantă) neconfirmate.

În Marea Britanie, unde au fost identificate peste 120 de cazuri de noua variantă CJD asociată cu consumul de carne de vită contaminată cu BSE, există o unitate epidemiologică care monitorizează tendința morbidității specifice și factorii de risc implicați în transmisie, inclusiv cei iatrogeni.

În UE există legislație specifică privind monitorizarea BSE la bovine, TSE la ovine și caprine, precum și pentru procedeele de prelevare a eșantioanelor și de testare, procedeele de genotipare pentru proteinele prionice.

Bovinele testate în 2003 au fost în număr de peste 10 milioane în EU-15 (cele 15 state membre la 1 ianuarie 2003) plus 945 042 în cele 10 state nou primite (EU+10). Numărul animalelor suspecte a fost 2 578 în EU-15 și 195 în EU+10.

PROPAGAREA INFECȚIEI PRIONICE DE LA POARTA DE INTRARE

În majoritatea cazurilor umane de noua variantă CJ (nvCJ), precum și la bovine, poarta de intrare a prionului nvCJ este digestivă. La fel ca și la alte virusuri, propagarea spre SNC se poate face pe cale axonală sau prin contaminarea unor elemente figurate din sânge care vor vectoriza prionii către SNC. Studii cantitative recente au arătat că prionii pot coloniza limfocitele, macrofagele și celulele foliculare dendritice din ganglionii limfatici și din splină. Aceste ultime două organe conțin și replică prionii la titruri înalte și trebuie eliminate din

consum. Nu toate tulpinile prionice au acest limfotropism, însă în cazul nvCJ prionii colonizează extensiv ganglionii limfatici. Pornind de la această premisă s-a studiat posibilitatea detecției contaminării prionice în stadiul presimptomatic prin investigarea amigdalelor sau apendicelor umane recoltate după intervențiile chirurgicale la copii. Câteva mii de probe au fost testate în Marea Britanie detectându-se puține eșantioane pozitive.

MARKERI PENTRU CARACTERIZAREA PRIONILOR IMPLICAȚI ÎN nvCJ

Contextul epidemiologic care leagă epidemia la bovine (și la feline) de creșterea numărului de cazuri de boală CJ la om este susținut de descrierea unor *markeri surogat* care apropie agentul BSE de agentul noii variante CJ la om.

Primul marker este distribuția pierderilor neuronale care, în ambele infecții, în afara spongiozei pierderilor neuronale care, în culii superiori (o porțiune a căii optice). Acest fapt se evidențiază și la RMN ca "semnul pulvinar", o zonă bilaterală hiperintensă la nivelul talamusului posterior. Al doilea marker ține de proprietățile biochimice ale PrP^{Rez} care rezistă la proteoliza cu proteinaza K. Profilul electroforetic postdigestie enzimatică a PrP^{Rez} este un element de diagnostic. În plus, raportul PrP glicozilată/nonglicozilată este similar la BSE și nvCJ și diferit la boala Creutzfeldt Jakob sporadică. De notat că toate aceste particularități "de tulpină" se mențin după transmiterea experimentală a infecției la șoarece sau la maimuță. La cynomolgus, incubajia a fost de aproximativ trei ani, iar histopatologic s-au evidențiat spongioza corticală și depozite de plăci.

PERSPECTIVA EPIDEMIEI PRIONICE PANEUROPENE

În anul 2000 au fost diagnosticate 1 720 de cazuri noi de îmbolnăviri la bovine, din care peste 80% în Anglia și Irlanda. În Europa Continentală cele mai numeroase cazuri au fost raportate în Franța, Portugalia, Elveția.

În ceea ce privește cazurile umane, numărul lor a crescut la 36 în 2000, comparativ cu 14 în 1999, ceea ce a fost alarmant. Numărul previzibil al cazurilor umane a fost estimat potrivit unor modele matematice care iau în considerare incubajia probabilă (chiar peste 20 ani), precum și doza infectantă. Doze mari consumate determină incubajii scurte, mai ales la copii. Infectivitatea țesuturilor bovine contaminate crește exponențial în ultimele luni ale incubajiei. Numărul

estimat al cazurilor umane pentru anul 2040, în perspectiva cea mai pesimistă, este de 130 000, numai în Marea Britanie.

O problemă extrem de importantă este posibilitatea infecției asimptomatice cronice atât la om, cât și la animal. Aceasta nu va putea fi corect apreciată decât când vor fi disponibile kituri pentru diagnostic noninvaziv încă din incubație.

Alte căi de transmitere. În afara transmiterii alimentare, două alte căi trebuie atent monitorizate. În primul rând, transmiterea parenterală iatrogenă prin transfuzii, care a impus măsuri pentru securizarea sângelui. O serie de alte produse biomedicale conțin materii prime de origine bovină. Prezența serului de vițel în toate produsele preparate în culturi de celule a determinat o atentă evaluare a unor loturi de vaccin preparate cu ser de vițel provenind din insulele britanice. Trebuie menționat că întreaga colecție europeană de culturi de celule și de culturi de hibridoame pentru producția anticorpilor monoclonali este situată în Irlanda, iar riscul contaminării prionice a acestor culturi "de referință" nu este exclus.

Transmiterea materno-fetală a fost suspectată la cazurile apărute la copii. O incubație scurtă nu poate fi argumentată altfel. Transmiterea verticală este posibilă și la bovine, ceea ce constituie o explicație pentru apariția continuă a cazurilor de BSE, după interzicerea adausului alimentar al făinii din carcasele animalelor sacrificate. În ciuda măsurilor de control stricte implementate în Marea Britanie, un număr mic dar semnificativ de îmbolnăviri BSE continuă să apară.

MĂSURI PROFILACTICE

La cunoscutele măsuri de limitare a includerii în alimentație a anumitor organe și țesuturi din carnea de bovine sunt luate în considerare următoarele:

- limitarea transfuziei de sânge provenit de la rezidenții din Marea Britanie sau utilizarea numai a sângelui după leucodepleție. Această recomandare pornește de la constatarea contaminării limfocitelor la bolnavi (deși infectivitatea limfocitelor este de 100 ori mai mică decât cea a splinei);
- excluderea produselor derivate din țesuturi de bovine în prepararea unor medicamente, vaccinuri și cosmetice;
- supravegherea eventualității transmiterii verticale a bolii prionice;
- verificarea unor metode de diagnostic precoce, noninvazive, pentru screeningul bovinelor sacrificate;
- controlul permanent al implementării măsurilor deja acceptate.

Glosar

TSE sau EST - Encefalopatii Spongiforme Transmisibile - boli prionice detectate la om și la alte specii animale: scrapie la oi; *cow mad disease* la bovine; encefalopatia spongiformă a felinei etc.

TSE umane - encefalopatii spongiforme transmisibile umane sunt:

- Boala Creutzfeldt Jakob sporadică (adesea iatrogenă, rareori familială).
- Boala Gerstmann-Sträussler-Scheinker (ataxie progresivă familială și demență).
- Insomnia fatală familială.
- Boala kuru (endemică în anii '60 în Papua - Noua Guinee).

BSE - *Bovine Spongiform Encephalopathy* - encefalopatia spongiformă bovină sau boala vacii nebune.

nvCJ - noua variantă a bolii Creutzfeldt-Jakob - encefalopatie spongiformă umană transmisă de la bovine (diferită de boala Creutzfeldt-Jakob sporadică).

MBM - *Meat and Bone Meal* - făină de proteine animale produsă din carnea și oasele animalelor sacrificate și folosite ca adaos alimentar în hrana rumegătoarelor. **Acest adaos alimentar este considerat elementul contaminat prionic care a determinat epidemia BSE. Din iunie 1994 acest adaos alimentar a fost interzis.**

SBO - *Specified Bovine Offals* - organele de la bovine care prezintă riscul cel mai înalt de transmitere a BSE: creier, măduva spinării, timus, amigdale, splină, intestine, de la animale în vârstă de peste 6 luni.

SBM - *Specified Bovine Materials* (SBO plus întregul cap și ochii etc.).

SRM - *Specified Risk Materials* (SBO plus aceleași organe de la oi și capre).

Sinteză

Encefalopatia spongiformă bovină sau boala vacii nebune se poate transmite la om prin consumul cărnii infectate (mai ales anumite organe) sau prin folosirea unor produse extrase din carne (lanolină, collagen etc.), uneori folosite de industria farmaceutică sau a cosmeticelor. nvCJ - noua variantă a bolii Creutzfeldt Jakob, este encefalopatia spongiformă umană transmisă de la bovine, diferită de boala Creutzfeldt Jakob sporadică, prin caracteristici clinice și de laborator.

BIBLIOGRAFIE

www.europa.eu.int/comm/food/fs/bse/index

www.foodstandards.gov.uk

www.bsereviews.org.uk

www.cdc.gov/eid

Butler D. Nature 1996;381:544.

Moynagh J, Schimmel H. Nature 1999;400:105.

Deslys JP et al. Nature 2001;409:476.

Schiermeier Q. Nature 2001;409:658.

VIRUSURI ȘI CANCER

De reținut:

Virusuri aparținând la patru familii virale (retro-, hepadna-, papova- și herpesviridae) sunt etiologic asociate cu diferite forme de cancer la om. Studiul retrovirusurilor a adus importante progrese în înțelegerea carcinogenezei virale. Genele retrovirale esențiale pentru oncogeneză (oncogene) sunt copii modificate ale unor gene celulare normale numite protooncogene. Cancerul este însă un sistem biologic complex, care nu poate fi redus la dereglarea câtorva oncogene sau antioncogene. Virusurile sunt carcinogeni semnificativi, alături de cofactori genetici sau din mediu. Oncoliza virală, prioritate românească, este o posibilă bioterapie în cancer (Levaditi C și Nicolau S. *Virus et tumeurs. Ann. Inst. Pasteur* 1923;37:1-3.). Oncoliza virală este reluată în prezent prin utilizarea vectorilor virali în terapia genică a cancerului.

Istoric. În 1908, Ellerman și Bang au emis ipoteza etiologiei virale a cancerelor observând modul de transmitere al leucemiei aviare. În 1911, Peyton Rous demonstrează că agentul infecțios din sarcomul aviar este ultrafiltrabil. Descoperirile lui Shope privind etiologia virală a carcinoamelor maligne la iepurii domestici și ale lui Gross asupra unui agent viral transmis prin alăptare, responsabil de tumori mamare la șoarece consolidează ipoteza implicării virusurilor în oncogeneză. Argumentele ulterioare au constatat în producerea cancerului experimental la animale inoculate cu virus și în inventarierea unui număr mare de cancere "spontane" de etiologie virală la multe specii animale. Mai multe premii Nobel pentru Medicină au fost atribuite unor studii fundamentale privind etiologia virală a cancerului:

- 1966 - Peyton Rous pentru descoperirea retrovirusurilor tumorale;
- 1975 - David Baltimore, Howard Temin și Renato Dulbecco pentru studiul interacțiunii dintre virusurile tumorale și materialul genetic celular;

1989 - Michael Bishop și Harold Varmus pentru descoperirea originii celulare a oncogenelor retrovirale.

Pentru cancerul uman, determinismul viral a fost probat în cazul neoplasmelor de col uterin, al neoplasmelor nazofaringiene, hepatice și ale organelor limfohematopoietice. Deși unele virusuri umane (adenovirusuri, herpesvirusuri etc.) sunt carcinogene la animal în condiții experimentale, aceasta nu implică totdeauna un efect similar la om.

Virusurile cancerelor umane nu sunt carcinogeni eficienți. Mai mult, cultivarea acestor virusuri in vitro, în culturi celulare, este fastidioasă. Tehnologia ADN recombinant constituie singurul mijloc practic pentru manipularea virusurilor oncogene și pentru identificarea evenimentelor din ciclul replicativ cu semnificație pentru carcinogeneză. În ultimele decade, aplicând noua tehnologie, s-a precizat existența a două categorii de virusuri oncogene: unele care poartă gene care induc direct cancerul, altele care inseră porțiuni ale genomului viral în genomul celulei gazdă, alterându-i funcționalitatea.

CADRU GENERAL

80-90% din cancerul uman rezultă în urma acțiunii unor factori exogeni numiți carcinogeni. Analiza registrelor asupra incidenței cancerelor în jurul anului 2000 nota apariția a 8,4 milioane cazuri noi anual, distribuite practic egal între sexe.

Principalele cauze de mortalitate în 1950 și 2000

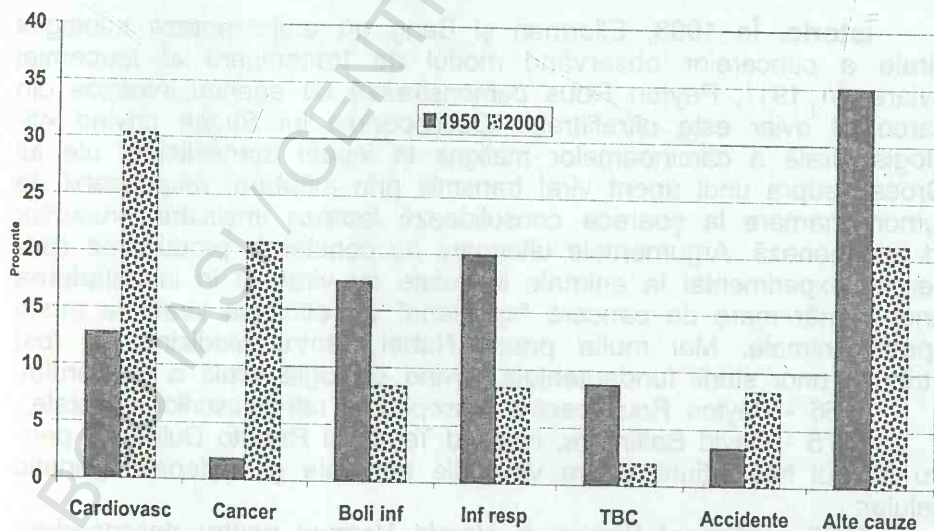


Fig. 34.1. Principalele cauze de mortalitate în 1950 și 2000.

La bărbați se remarcă incidența cancerelor cu prognostic sever (plămân, stomac, esofag, prostată), în timp ce la femei predomină cancere cu șanse bune de supraviețuire (sân, uter) (tabelul 34.I). Pentru toate localizările anatomice, cancerele apar mai timpuriu în cursul vieții la bărbați. Semnificația acestor constatări asupra evoluției viitoare a incidenței trebuie avută în vedere în măsura în care ne așteptăm la sporirea speranței de viață. Creșterea incidenței cancerelor (fig. 34.1) a modificat profund prioritățile sănătății publice precum și ale cercetării biomedicale.

Primele 10 cauze de mortalitate prin cancer în Marea Britanie în 2002 (după Burnet NG et al, 2005), ca proporție din numărul total de decese prin cancer dau o imagine asupra localizărilor frecvente și vârstei la care este pus diagnosticul.

TABELUL 34.I

LOCALIZĂRILE FRECVENTE ALE BOLII CANCEROASE

Localizare	Mortalitate	Ani viață pierduți prin cancer
Plămân	20,9	21,7
Colon+rect+anus	16,5	14,5
Mamar	13	15,5
Prostată	10,2	5,5
Stomac	6,4	6,2
Vezică urinară	5,3	3,4
Pancreas	4,1	4,3
Limfom	3,6	4,2
Esofag	3,2	3,2
Leucemii	3	3,6

În contrast cu carcinogenii chimici și fizici care alterează informația genetică celulară, virusurile introduc un spor de informație genetică în celula gazdă (intracromozomial sau plasmidian). Prezența secvențelor genomice virale este pecetea celulelor tumorale viral transformate. Proliferarea acestor celule în condițiile unei citolize virale reduse permite acumularea de mutații, apariția și expansiunea unor clone celulare tumorigene. În fapt, modelul acceptat azi pentru carcinogeneza virală este similar celui propus pentru carcinogenii chimici. Trei faze distincte se succedă (tabelul 34.II):

- **inițierea** - determinată de modificări genetice induse de doze subcarcinogene ale unor agenți transformanți;
- **promovarea** - atributul unor factori necarcinogeni care cresc frecvența sau scad latența apariției tumorilor;
- **progresia** - consecința acțiunii persistente sau a noilor expuneri la agenții transformanți.

Apariția tumorilor este deci rezultatul unor alterări genetice conjugat cu acțiunea unor factori exogeni, între care virusurile sunt carcinogeni comuni. Transformarea viral indusă a celulelor în cultură este privită ca un fenomen in vitro corespunzător inducției tumorilor in vivo, la animal.

CARACTERISTICILE CELULELOR TRANSFORMATE

În afara infecției litice care presupune replicarea virală și distrugerea celulei gazdă, virusurile pot interacționa persistent cu gazda, introducând noi secvențe informaționale. ADN viral este menținut chiar dacă gene virale relevante nu sunt exprimate.

TABELUL 34.II

CARACTERISTICILE COMPARATIVE ALE STADIILOR DE INIȚIERE ȘI PROMOVARE

Caracteristică	Inițiere	Promovare
Patogenie	Mutație	Alterarea expresiei genice
Reversibilitate	Nu	Da
Durată	Rapid	Lent (ani, decade)
Număr mutații	Unic	Multiplu
Prag	Absent	Prezent
Evenimente aditive	Da	Nu
Vizualizarea procesului	Neidentificabil	Vizibil

De exemplu, pentru HTLV I și EBV, genele virale care contribuie la inițierea carcinogenezei nu mai sunt exprimate în celulele tumorale propriu-zise. Invers, pentru papillomavirusuri, numai acele gene care au participat la inițiere sunt exprimate și în celulele tumorale.

În ambele cazuri, celula tumorală din vivo este reprodusă de celulele viral transformate in vitro. Diferențierea lor în raport cu celulele normale se face pe baza următoarelor proprietăți:

1. conțin gene virale implicate în imortalizarea lor in vitro;
2. inoculate la unele animale produc tumori;
3. sunt morfologic distincte (rotunde, refringente) și se dispun dezordonat, diferit de țesutul din care derivă;
4. au un mod de multiplicare haotic: nu au inhibiție de contact și nu depind de ancorarea la substrat;

5. au cerințe nutritive modice; se pot divide la concentrații scăzute de ser de vițel *in vitro*;

6. glicoliza anaerobă este sursa principală de energie;

7. posedă antigene de suprafață diferite de celulele normale: unele sunt codificate de virusuri, altele sunt codificate de gazdă (aparitia lor este urmare a expresiei unor gene normal represate sau a unor determinanți normal mascați);

8. sunt ușor aglutinate de lectine (proteine vegetale care găsesc noi situsuri de legare pe suprafața celulelor transformate);

9. au o compoziție modificată a componentelor membranei plasmatică vizând glicolipidele, glicoproteinele și, mai ales, absența fibronectinei (absența fibronectinei explică scăderea interacțiunilor intercelulare, creșterea fluidității membranale și, deci, facilitarea accesului la nutrienți);

10. prezintă modificări în kinetica mesagerilor secundari (AMP ciclic, fosfoinozotide etc.);

11. prezintă modificări cromozomiale care duc la un cariotip aneuploid.

MECANISMELE TRANSFORMĂRII CELULARE CU ONCOVIRUSURI ARN

Două aspecte ale transformării celulare cu oncovirusuri au semnificație pentru înțelegerea carcinogenezei *in vivo*:

- transformarea este însoțită de persistența genomului viral integral sau în parte;

- transformarea este urmată de expresia continuă a unui număr limitat de gene virale (de multe ori una singură).

Setul de gene celulare sau virale care funcționează ca efectori ai carcinogenezei virale se numesc *oncogene*, iar proteinele codificate - **oncoproteine**. Sunt unele din cele mai conservate gene din evoluția speciilor - ceea ce argumentează rolul lor determinant în funcționarea celulei normale. Oncoproteinele funcționează în lanțuri de semnale mitogene ca (în paranteze, exemple de oncogene):

- factori de creștere (*sis*);
- receptori membranali pentru factorii de creștere (*erb B*);
- elemente ale aparatului de semnalizare submembranar (*src*);
- elemente citosolice cu rol de mesageri secundari solubili (*ras*);
- proteine nucleare (*jus, fos, myc*);
- receptori hormonalți (*erb A*).

Există gene celulare normale omoloage cu secvențe din genomul retroviral. Aceasta înseamnă că una din spirele genomului uman conține o secvență de nucleotide, complementară secvenței oncogene, iar numele ei este de **protooncogenă**. În celulele netransformate pro-

tooncogenele nu sunt oncogene. Condițiile care conduc la activarea lor sunt modificări structurale: deleții, mutații sau fuziunea în himere alcătuite din gene celulare și virale. Modificările structurale determină modificări funcționale, care sunt numai enumerate pentru unele oncogene mai importante. Modificările structurale în cazul oncovirusurilor sunt:

- integrarea în genomul viral a unui protooncogen care poate fi apoi tradus;
- inserția genelor virale în vecinătatea unui oncogen celular (care poate fi activat sau supresat) (fig. 34.2).

Oncovirusurile se împart în două categorii (vezi capitolul 23):

- transformante in vitro și rapid oncogene in vivo (săptămâni);
- nontransformante și lent oncogene (luni).

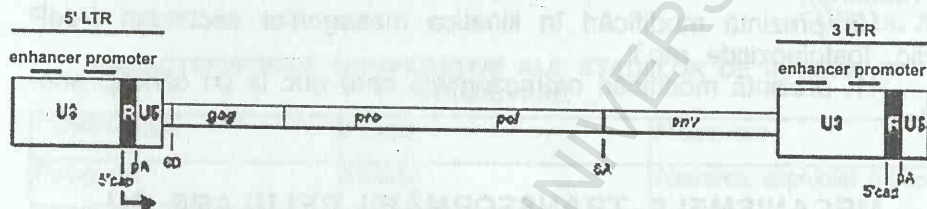


Fig. 34.2. Organizarea genomului retroviral. La ambele capete provirusul conține LTR (long terminal repeats) cu care se poate insera în genomul celulei gazdă. Fiecare LTR conține secvențe promotor, enhancer și secvențe semnal. Prin infecție cronică, oncovirusurile determină mutageneză inserțională. Principalele gene sunt gag (capsidă), pol (RT-ază) și env (anvelopă).

Retrovirusurile rapid oncogene induc tumori policlonale datorită expresiei unor oncogene virale. Oncogenele virale reprezintă versiunea oncogenă a unor gene celulare normale. Retrovirusurile lent oncogene induc tumori mono- sau oligoclonale datorită mutațiilor cauzate de inserția provirusului retroviral în genomul gazdei (și nu datorită expresiei unor oncogene).

ONCOGENE

Oncogenele sunt forme modificate ale unor gene celulare normale numite protooncogene. În cancerle umane protooncogenele sunt situate în regiuni fragile ale unor cromozomi și sunt ținta frecvență a mutațiilor. Proteinele codificate de protooncogene sunt implicate în:

- diviziunea celulară,
- diferențierea celulară.

Au fost identificate peste 20 de perechi de oncogene/protooncogene, toate având un rol critic în răspunsul celular la sem-

nalele externe care controlează proliferarea și diferențierea. Protooncogenele sunt ținte atât pentru inițierea carcinogenezei chimice, cât și a celei virale.

În celulele canceroase progresia corectă a ciclului celular (mitozei) în diviziune este alterată; celulele canceroase se divid necontrolat. Activarea mai multor oncogene și inactivarea unor antioncogene este necesară pentru transformarea canceroasă a celulelor, pentru achiziția fenotipului malign. Oncogenele se grupează în mai multe categorii ca, de exemplu:

- oncogene de imortalizare (care blochează îmbătrânirea celulară sau/și apoptoza);
- oncogene care reduc nevoile celulei în factori de creștere.

Majoritatea oncogenelor au fost inițial izolate ca protooncogene preluate de oncovirusuri și numite oncogene virale (*v-onc*) în contrast cu replicile lor celulare (*c-onc*).

Prima oncogenă virală (*v-src*) a fost descoperită de Peyton Rous în 1911, la virusul sarcomului Rous la păsări. Importanța acestei descoperiri a fost recompensată tardiv cu premiul Nobel pentru Medicină, în 1966, pentru semnalarea virusurilor oncogene. Rolul protooncogenelor din familia *myc* a fost demonstrat de Varmus și Bishop în neuroblastom. Este imposibilă prezentarea detaliată a modificărilor funcționale determinate de activarea oncogenelor. Câteva exemple ilustrează însă diversitatea mecanismelor implicate:

- *sis* este o oncogenă a virusului simian care determină sarcoame, oncoproteina codificată are funcție de factor de creștere (*platelet derived growth factor*) și conduce la o transformare autocrină;
- *erb B* a fost izolată la retrovirusuri aviare și expresia ei conduce la alterarea unor receptori fiziologici pentru factorii de creștere (*epidermal growth factor*) și la inițierea unor semnale mitotice;
- *src* - prima oncogenă izolată - codifică o fosfoproteină submembranală cu rol reglator în activitatea unei enzime implicate în diferențierea celulară (protein kinaza tirozin specifică);
- *ras* - există cel puțin 3 gene *ras* care codifică oncoproteine omoloage cu proteinele G care intervin în transducerea semnalelor mitogene. Toate tumorile induse de carcinogeni chimici conțin gene *ras* activate.

În timp ce în celule normale mai multe protooncogene sunt transcrise simultan, în celulele transformate cancerigen o singură protooncogenă se exprimă în cantități mari. Astfel, în leucemia promielocitară și în majoritatea limfoamelor se exprimă nivele înalte de *c-myc*; în cancerul vezicii urinare *c-ras*; în plasmocitoze *c-mos* etc. Specificitatea pentru celula țintă nu este dependentă de spectrul de gazdă al virusului, ci este o proprietate intrinsecă a protooncogenei, care joacă rolul de reglator al creșterii celulare. Această concluzie este sprijinită de faptul că un exces de oncoproteină este capabil să

inhibe maturarea precursorilor hematopoietici, dând naștere neoplasmelor cu celule B sau T în diferite stadii de dezvoltare asociate cu transcrierea excesivă a respectivei oncogene.

Virusurile care posedă oncogene determină transformare prin integrarea protooncogenelor celulare în genomul proviral și exprimarea lor excesivă sub controlul LTR virale. Întrebarea care se pune privește mecanismul prin care virusurile care nu au oncogene reușesc să determine transformarea protooncogenelor cu funcții normale în celulă în factori transformanți, neoplazici. Explicațiile propuse vizează muta-geneza inserțională, amplificarea genică a ADN ce conține protooncogena sau mutații prin alterarea structurii proteinei codificate de protooncogenă. Translocațiile cromozomiale par a fi un mecanism important al carcinogenezei. Astfel, o translocație între cromozomul 8, care conține gena c-myc, și cromozomii 14 (care codifică lanțul greu al imunoglobulinelor) sau cromozomii 2 și 22 (care codifică lanțul ușor al imunoglobulinelor) este constant demonstrată în limfomul Burkitt.

ANTIONCOGENE

Cancerul este urmarea acumulării unor mutații moștenite sau dobândite în trei categorii de gene:

1. protooncogene,
2. antioncogene ("*tumor suppressor genes*"),
3. gene de reparare a ADN.

În general, modificările care generează cancer induc activarea protooncogenelor și inhibarea sau pierderea funcției antioncogenelor. Similar, genele de reparare își pierd funcția în cursul transformării maligne, încât pot fi asimilate antioncogenelor. Câteva din cele mai cunoscute antioncogene sunt **pRb** (pentru proteina retinoblastomului), **p53** ("paznicul genomului") și încă aproximativ 20 de gene. Identificarea antioncogenelor a fost foarte dificilă, însă în multe cazuri acțiunea lor a fost sesizată în cancere cu etiologie virală. În astfel de situații se produce o infecție abortivă, limitată la sinteza proteinelor virale timpurii. Unele din aceste proteine virale timpurii fuzionează cu proteinele codificate de antioncogene și le anihilează. De exemplu, în cancerul de col uterin, proteinele papillomavirusurilor umane E7 și E6 pot sechestra antioncogenele pRb și p53.

MECANISMELE TRANSFORMĂRII CELULARE CU DEZOXIRIBOVIRUSURI

Dezoxiribovirusurile au fost asociate cu cancere umane (tabelul 34.III) mai mult pe baza unor argumente indirecte derivate din studii

seroepidemiologice. Înțelegerea mecanismelor moleculare ale rolului carcinogen al virusurilor ADN este bine ilustrat de papillomavirusuri.

Spre deosebire de oncogenele oncovirusurilor ARN, care derivă din protooncogene celulare, virusurile ADN sunt transformante prin intermediul unor gene virale timpurii cu rol dublu: în replicarea virală și în transformarea celulară.

Virusurile ADN care conțin astfel de gene interacționează cu celula gazdă în două situații alternative, reciproc exclusive:

- **infecția productivă**, care determină sinteza de progeni infecțioși și moartea celulei gazdă sau

- **infecția nonproductivă**, în care ciclul replicativ viral este abortiv iar celula gazdă este transformată.

În acest ultim caz, genomul viral (parțial) este integrat în genomul celular și continuă să exprime mai ales genele timpurii cu potențial oncogen semnificativ.

TABELUL 34.III

PROPRIETĂȚILE FAMILIILOR DE VIRUSURI ONCOGENE

Familia	Virusul oncogen	Numărul de gene virale	Tipul/dimensiunea genomului
Retro	HTLV I	5	ARNss/8 kb
Hepadna	HBV	4	ADNds 3,2 kb
Papilloma	HPV 16, 18, 31	10	ADNds 9 kb
Papova	SV40		ADNds
Gammaherpes	EBV, HH8	100	ADNds 170 kb

Proteinele transformante ale virusurilor ADN sunt multifuncționale. Multifuncționalitatea derivă în parte din capacitatea lor de a interacționa cu proteinele celulare. Există pentru fiecare din aceste proteine mai multe domenii structurale și/sau funcționale capabile să interacționeze cu proteinele celulare, independent sau grupat. Extrem de interesantă este semnalarea unor regiuni locale de omologie între proteinele celulare și oncoproteinele virusurilor ADN. Aceasta sugerează derivarea lor evolutivă din proteine celulare sau din "motive" funcționale comune unor proteine celulare. Interacțiunea proteine celulare - oncoproteine ale virusurilor ADN poate să se rezume la două situații:

- activarea unor protooncogene;
- inactivarea unor antioncogene.

Papillomavirusurile. Cel mai cunoscut exemplu pentru *activarea* unor protooncogene este interacțiunea antigenului T mediu (polyomavirus) - oncogenă celulară *src*, care conduce la stimularea activității intrinseci de protein kinază a *src* și interferarea mecanismului

normal de creștere celulară. Acest antigen T mediu al polyomavirusurilor are funcții diferite, după cum ne referim la infecțiile productive sau nu. În primul caz, el induce permisivitatea și contribuie la asamblarea progenilor infectanți; în al doilea caz, menține transformarea și induce modificările morfologice și de creștere caracteristice acestei stări.

De notat că și alte antigene virale ale polyomavirusurilor: antigenul T extins și antigenul t mic au proprietăți similare. În plus, inducând și neoantigene la suprafața celulelor transformate, aceste antigene numite inițial TSTAs (*tumor specific transplantation antigens*) realizează o posibilitate reală de supraveghere a formării tumorilor. Totuși, trebuie remarcat că, în timp ce tumorile incipiente sunt efectiv eliminate, virusurile însăși nu sunt. Aceste virusuri stabilesc infecții lente care persistă în ciuda unor nivele semnificative de anticorpi. În cazul unor situații patologice care conduc la imunosupresie, potențialul transformant sau citolitic al virusurilor latente poate fi relevant. Un alt mecanism prin care răspunsul imun este eludat constă în inhibarea expresiei antigenelor codificate de complexul major de histocompatibilitate în unele infecții virale.

Pentru *inactivarea unor antioncogene* este caracteristică interacțiunea oncoproteine virale - proteine celulare care controlează creșterea celulară. Excluzând supresia creșterii celulare (funcție normală a antioncogenelor) se realizează în fapt promovarea carcinogenezei. O genă transmisă dominant care determină susceptibilitatea la apariția unei tumori congenitale - retinoblastomul (Rb) - funcționează ca inhibitor al carcinogenezei. Cuplat cu oncoproteine virale, produsul genei Rb pierde funcția supresoare și carcinogeneza este promovată. Nu mai puțin de 3 proteine codificate de virusuri diferite: adenovirus (proteina E1A), virusul SV40 (antigenul T extins) și papillomavirusul uman tip 16 (proteina E7) pot cupla produsul genei Rb într-o secvență constantă de 14 aminoacizi.

În afara papovavirusurilor și adenovirusurilor mai există încă 3 familii de dezoxiribovirusuri transformante.

Gammaherpesvirusurile sunt clar implicate în etiologia unor cancere umane.

Virusul Epstein-Barr (EBV). Este unul din cele 2 herpesvirusuri B limfotrope, tumorigene pentru om, implicat în cancere umane - *limfomul Burkitt* în Africa de Est și Noua Guinee și *carcinomul nazofaringian* din sudul Chinei și Algeria. Virusul nu se integrează în genomul gazdei, ci este prezent ca porțiuni circulare, episomale. Multe limfoame Burkitt conțin ADN-EBV, precum și un antigen numit antigenul nuclear al virusului EB (EBNA), dar multiplicarea virală productivă nu apare decât la o mică proporție - poate și datorită hipermetilării, proprietate a regiunilor genetice silențioase.

Cu toate acestea, există tumori tip limfom Burkitt, mai ales cele din afara Africii, care nu au nici EBNA, nici ADN viral, ceea ce demonstrează că dacă EBV este agentul etiologic al acestor carcinome, și alți cofactori sunt sigur implicați.

HH8 sau herpesvirusul asociat sarcomului Kaposi a fost izolat din tumorile omonime apărute în faza de SIDA a infecției HIV. Imunosupresia este cofactorul asociat în acest caz. Trei cancere "oportuniste" complică evoluția SIDA și scurtează viața bolnavilor:

- sarcomul Kaposi determinat de herpesul uman 8;
- carcinomul de col uterin sau alte tumori anogenitale determinate de papillomavirusurile umane cu potențial oncogen HPV 16, 18 și 31 (dar și alte tipuri);
- limfoame nediferențiate determinate de infecția EBV.

Poxvirusurile. Două poxvirusuri sunt tumorigene: virusul fibromului Shope, patogen pentru iepure și virusul Yaba patogen pentru maimuță. Interesul pentru tumorigenitatea poxvirusurilor vine din faptul că replicarea lor se petrece în citoplasmă. Se pare însă că deși o fază nucleară nu este obligatorie, segmente de ADN viral se găsesc în nucleu, unde devin integrate, ceea ce ar fi semnalul evoluției spre carcinogeneză. Integrarea nu este însă stabilă, odată ce tumorile regresează deseori.

Hepadnavirusurile. Prin reprezentantul lor, virusul hepatitei B, sunt frecvent asociate cu infecții cronice, progresive, cu ciroză și carcinom primitiv hepatic (CPH). Nu se cunoaște precis mecanismul carcinogenezei VHB, însă studii recente, în linii celulare derivate din CPH, au evidențiat hiperexpresia unor inhibitori ai apoptozei care contribuie la imortalizarea hepatocitelor infectate. Peptidele virale codificate de genele preS2 și X sunt implicate în cancerizare.

Concluzii

Transformarea celulară in vitro și carcinogeneza in vivo recunosc ca element comun modificările genomului celular. Virusologii au identificat gene-cheie (oncogene) care, adiționate, deletate sau alterate, modifică genomul celular și promovează carcinogeneza. Oncogenele celulare sunt traduse sau activate de oncovirusuri (ribovirusuri). Oncogenele virale sunt caracteristice dezoxiribovirusurilor cu potențial malign, iar genele supresoare ale carcinogenezei (antioncogene) pot fi inactivate de proteine timpurii ale virusurilor ADN.

În ciuda dovezilor clare pentru etiologia genetică a cancerelor, factori epigenetici pot avea rol carcinogen sau, dimpotrivă, supresor, explicând reversibilitatea transformării maligne în unele situații. Argumentele virusologiei medicale pentru etiologia unor cancere umane încep să capete semnificație practică odată cu utilizarea unor vaccinuri virale (hepadnavirusuri, papillomavirusuri) pentru profilaxia

unor cancere și cu folosirea unor vectori virali pentru bioterapia cancerelor prin oncoliză virală.

BIBLIOGRAFIE

Levaditi C, Nicolau SȘt. Prima semnalare a oncolizei virale. *Virus et tumours. Ann. Inst. Pasteur* 1923;37:1-3.

Gross L. Primul tratat asupra relațiilor virus - cancer. *Oncogenic Viruses*. Pergamon UK, Oxford, 1970.

Bishop JM. Prima semnalare asupra oncogenelor virale. *Viral oncogens. Cells* 1985;42:23-38.

Hahn WC, Weinberg RA. Definirea celulei tumorale umane în termeni moleculari. *Modelling the molecular circuitry of cancer. Nature Rev. Cancer* 2002;330-340.

MONITORIZAREA TERAPIEI ANTIVIRALE

De reținut:

Rezistența la antivirale este un factor major care contribuie la eșecul terapiei. Testele de rezistență recomandate în clinică pot demonstra că eșecul virusologic se datorează aderenței scăzute a pacientului sau pot identifica anumiți agenți antivirali care trebuie evitați. Testele de rezistență nu pot detecta cu certitudine quasispeciile minoritare, iar mutațiile complexe care apar după eșecul virusologic prelungit fac ca interpretarea testelor să fie foarte dificilă. Pentru a complica și mai mult situația, unele mutații cresc susceptibilitatea la un anumit medicament sau pot reface susceptibilitatea (mutații compensatorii), ducând la apariția tulpinilor hipersusceptibile.

Virusologia se află într-o perioadă fastă în care progresele biologiei moleculare au făcut posibile sesizarea unor verigi ale ciclului replicativ viral, care pot fi blocate specific fără a altera funcționalitatea celulei gazdă. În ultimii ani, autoritățile pentru controlul medicamentelor (FDA în Statele Unite - www.fda.gov; EMEA în Uniunea Europeană - www.emea.eu) au aprobat mai multe medicamente antivirale cu index terapeutic bun (raport bun între concentrația minim activă și concentrația maximă tolerată) și formularea unor combinații de medicamente cu efecte aditive sau sinergice. În plus au fost sintetizați compuși ușor administrabili (oral sau topic) și cu preț de cost scăzut. În acest capitol se discută aspecte generale legate de utilizarea medicamentelor antivirale rezultate din practica folosirii anti-retroviralelor în terapia infecției HIV. Sunt date extrem de importante pentru a preveni probleme de genul celor create de administrarea nejustificată și neprofesională a antibioticelor în cazul infecțiilor bacteriene. Lecția dezvoltării tulpinilor bacteriene cu rezistență multiplă trebuie înșușită și în cazul terapiei virozelor.

Cele mai mari progrese s-au realizat în domeniul:

- **agenților antiherpetici** - în special analogi nucleozidici ce competiționează cu nucleozidele normale și cu enzimele implicate în sinteza acizilor nucleici virali,

- **medicamentelor antiretrovirale** - odată cu introducerea politerapiei divergente de înaltă eficiență (HAART) - ce combină chimioterapice din mai multe clase:

1. inhibitori ai reverstranscriptazei analogi nucleozidici (NRTI);
2. inhibitori nonnucleozidici ai reverstranscriptazei (NNRTI);
3. inhibitori de protează virală (PI);
4. inhibitori ai fuziunii și internalizării etc.

- **combinațiilor active în hepatitele virale B și C** bazate pe utilizarea unor forme de interferon pegylat, cu absorbție mai bună și timp de înjumătățire crescut în asociere cu antiretrovirale (în hepatita B) sau cu ribavirina (în hepatita C),

- **inhibitorilor de neuraminidază gripală** (zanamivir și oseltamivir fosfat),

- **anticorpilor monoclonali** activi în infecția cu virusul respirator sincițial (tabelul 35.I).

TABELUL 35.I

MECANISMUL ȘI SPECTRUL DE ACȚIUNE AL PRINCIPALELOR MEDICAMENTE ANTIVIRALE

Antiviralul	Mecanism de acțiune	Acțiunea antivirală este:	
		Dovedită	Posibilă
Acyclovir, Valacyclovir	Inhibă ADN polimeraza virală, după metabolizare în acyclovir trifosfat	VHS, VZV	EBV, CMV
Gancyclovir	Inhibă ADN polimeraza virală, după metabolizare în gancyclovir trifosfat	CMV	VHS, VZV, EBV, HH8
Pencyclovir	Inhibă ADN polimeraza virală, după metabolizare în pencyclovir trifosfat	VHS	
Famcyclovir	Este metabolizat în pencyclovir	VHS, VZV	VHB
Foscarnet	Inhibă ADN polimeraza virală și reverstranscriptaza	CMV, VHS tulpinile rezistente la acyclovir	HH8
Cidofovir	Activat la derivatul difosfat de enzime celulare	CMV	
Ribavirina	Interferă cu ARNm viral, probabil și imunomodulator	VHC (hepatite cronice) hantavirusuri, v. Lassa	v. paragripale, gr-pale A, B, VRS, v. rujeolos
Lamivudina și alți NRTI	Inhibă reverstranscriptaza	HIV, VHB (în hepatitele cronice),	
Amantadina Rimantadina	Blochează canalul ionic al proteinei M2 și abilitatea acestuia de a modula pH-ul intracelular	v. gripal A	

TABELUL 35.1 (continuare)

Zanamivir Oseltamvir	Inhibă selectiv neu- raminidaza virală	v. gripal A și B	
Interferon alfa, Peginterferon	Induce enzime celulare ce interferă cu sinteza pro- teinelor virale	VHB, VHC, HH8, VHD Papillomavirusuri	
Palvizumab	Anticorp monoclonal neutra- lizant	VRS	

Prescurtări: VHS - herpes simplex 1 și 2; VZV - v. varicela-zoster; CMV - v. citomegalic; EBV - v. Epstein-Barr, HH8 - v. herpetic uman 8; VHB - v. hepatitic B; VHC - v. hepatitic C; VRS - v. respirator sincițial.

EFICIENȚA TRATAMENTULUI ANTIVIRAL

Factorii care influențează eficiența tratamentului antiviral sunt: coeficientul de inhibiție, bariera genetică de rezistență și aderența la terapie.

Coeficientul de inhibiție (CI) reprezintă o măsură de evaluare a activității antivirale a medicamentului. Se calculează ca fiind raportul dintre concentrația medicamentului în plasmă și concentrația inhibitorie CI_{50} in vitro (concentrația minimă necesară să inhibe 50% din replicarea virală). Acest coeficient corelează susceptibilitatea virusului pentru un medicament cu expunerea propriu-zisă la acel medicament. Cu cât valoarea acestui coeficient crește, cu atât replicarea virală va fi suprimată într-un procent mai mare și pe o perioadă mai lungă de timp.

Dacă, pentru un anumit medicament, concentrația inhibitorie este scăzută, atunci este foarte probabil să apară virioni rezistenți la acel medicament. Concentrația inhibitorie poate scădea considerabil datorită variațiilor individuale ale pacienților în privința capacității de adsorbție, metabolizare și excreție a medicamentelor. De exemplu, pot apărea diferențe datorate masei corporale, stadiului evolutiv al bolii, nivelelor enzimactice implicate în metabolizarea medicamentelor, clearance-ului renal etc.

Bariera genetică de rezistență reprezintă numărul de mutații necesare pentru a determina instalarea rezistenței fenotipice (crește de cel puțin patru ori concentrația inhibitorie la un medicament). Medicamentele cu barieră de rezistență ridicată asigură o suprimare a replicării virale pe perioade lungi și prin presiunile selective exercitate pot dirija replicarea virusului, contribuind la controlul infecției. Retro- și, în general, ribovirusurile prezintă o mare variabilitate gene-

tică, chiar în cazul izolărilor secvențiale de la același pacient. Variabilitatea este legată de erorile de transcripție ale polimerazelor și/sau reverstranscriptazei în cursul copierii ARN-ului, fapt datorat absenței unor sisteme enzimatice de corecție. Rata erorilor este de un nucleotid la 10^4 - 10^5 nucleotide. Dacă ținem seama că genomul HIV are aproximativ 10 000 de nucleotide, o asemenea rată a mutațiilor va induce în medie o mutație per genom per ciclu de replicare.

- În ciuda aparențelor, această rată a mutațiilor (comună tuturor retrovirusurilor) nu este excesivă, comparativ cu alte ribovirusuri (virusurile gripale, virusul hepatitei C, de exemplu). Marea variabilitate HIV este, mai curând, datorată dinamicii foarte active (10^{10} virioni/zi) a replicării în limfocitele activate. Astfel, în infecția HIV virusul infectant se va prezenta sub forma unei populații foarte heterogene de variante virale distincte, din care medicamentele vor selecta mutantele rezistente.

Aderența la terapie (numită și complianță) reprezintă principala cauză de scădere a concentrației medicamentului din plasmă. De aceea, aderența la tratament este importantă și trebuie reamintită pacientului la fiecare vizită medicală. Nerespectarea orarului de administrare a medicației, "sărirea" unor doze sau zile întregi de pauză în medicație, contribuie la eșecul terapiei și la selecția mutantelor rezistente. Pentru a anticipa dificultățile de aderență la antivirale trebuie ca programul personal, individual, al pacientului să fie adaptat la orarul de medicație.

MUTAȚII DE REZISTENȚĂ

Mecanismele cele mai frecvent incriminate pentru rezistența la antivirale sunt alterarea proteinei țintă sau activarea permeabilității celulare (pompe de eflux) pentru anumite medicamente.

Rezistența la antivirale este definită drept orice modificare care permite replicarea virusului în prezența unui inhibitor. Ea este întotdeauna raportată la populația virală preexistentă terapiei (virusuri sălbatic la pacienți "naivi" - care nu au primit niciodată un anumit medicament). Rezistența se manifestă ca un fenotip alterat, determinat de modificări genotipice. Astfel, datorită concentrației insuficiente de antivirale pentru a bloca complet replicarea virusului, apar variante virale care se adaptează rapid la concentrații din ce în ce mai mari ale medicamentului inhibitor. Aceste variante se vor replica mai repede ca virusul sălbatic și vor deveni quasispecia dominantă. În prezența presiunii selective exercitate de terapia antivirală, rata la care se acumulează mutațiile ce conferă rezistența depinde de rata replicării reziduale. Aceasta rată este invers proporțională cu concentrațiile inhibitorii plasmatic. S-a observat că, atunci când con-

centrația inhibitorie plasmatică este crescută, apar mai puține mutații într-o anumită perioadă de timp, și invers.

Au fost identificate două tipuri de mutații de rezistență:

- Mutații primare - mutațiile selecționate cel mai precoce, relativ specifice pentru o anumită clasă de antivirale și care au un efect evident asupra susceptibilității la antiretrovirale.

- Mutațiile secundare - mutațiile ce se acumulează în genoamele virale ce conțin deja una sau mai multe mutații primare.

Rezistența multiplă încrucișată este foarte importantă în decizia terapeutică. Antiretroviralele din cadrul unei clase pot selecționa mutații la nivelul acelorași codoni, inducând rezistență încrucișată cu alte clase sau rezistență multiplă. Acest lucru poate complica și limita deciziile ulterioare privind asocierile medicamentoase în terapia antivirală. Este vorba de un tip de rezistență pentru o întreagă clasă, caracteristic inhibitorilor de protează din terapia anti-HIV.

Testarea rezistenței este recomandată pacienților la care terapia a eșuat. La sfârșitul anilor '90, testele de evaluare a rezistenței au intrat în atenția clinicienilor cu valoare similară antibiogramelor din infecțiile bacteriene. Mai multe studii au arătat utilitatea acestor teste permițând identificarea medicamentelor la care pacientul a devenit rezistent, astfel încât a fost posibilă înlocuirea ținută a unui medicament și formularea altor asocieri medicamentoase.

TESTE DE REZISTENȚĂ

Astăzi sunt disponibile următoarele teste de rezistență la antiretrovirale: testele genotipice, testele fenotipice și fenotiparea virtuală.

Testele genotipice sunt teste ce pun în evidență mutațiile asociate cu rezistența la diferite antiretrovirale. Aceste teste detectează doar mutațiile specifice pentru care au fost proiectate.

Genotiparea este mai simplă, mai ușor de realizat decât fenotiparea, dar nu oferă informații complete despre rezistența la antiretrovirale. Genotiparea arată ce mutații sunt prezente, dar nu și nivelul de rezistență al virusului la antiretrovirale. Avantajele genotipării sunt: disponibilitate, rezultate rapide, tehnologie mai puțin pretențioasă și faptul că mutațiile genotipice pot preceda rezistența fenotipică. Dezavantajele au fost sesizate la confruntarea rezultatelor laboratorului cu evoluția pacientului: genotipul nu se corelează întotdeauna cu fenotipul, interpretarea este pretențioasă și greu de standardizat. Testele genotipice sunt insensibile când detectează speciile minore și nu evaluează interacțiunile dintre mutații. Susceptibilitatea virusului la antiretrovirale se poate determina prin genotipare, dar existența unui număr de peste 250 de mutații corelate cu rezistența face ca interpretarea acestor teste să fie sofisticată.

Există două metode de genotipare:

- Tehnologia "cipurilor" genetice, ce analizează genotipul folosind hibridizarea pe cipuri microlitografiate cu diferite sonde nucleotidice specifice. Intensitatea hibridizării este măsurată cu un fascicul laser și interpretată digital.

- Tehnica secvențierii genelor țintă pentru antivirale pornind de la izolatele virale de la pacient.

Pentru procesarea completă a datelor au fost create diferite algoritmi destinate să ajute clinicienii în interpretarea testelor genotipice. Aceste algoritmi variază când se interpretează mutațiile secundare și combinațiile de mutații de rezistență încrucișată la agenții antiretrovirali. Totuși, aceste algoritmi sunt limitate de evoluția rapidă a rezistenței HIV și de apariția unor noi medicamente.

Testele fenotipice sunt teste ce permit definirea concentrației de medicament care inhibă un anumit procent al replicării virale (concentrația inhibitorie 50% și 90%, respectiv, CI_{50} și CI_{90}). Fenotiparea este o metodă de evaluare directă a susceptibilității virale, măsoară eficiența diverselor antiretrovirale în cursul replicării virale, iar rezultatele testelor sunt ușor de interpretat. Fenotiparea are însă limite semnificative: este consumatoare de timp, dificil de executat, insensibilă la populațiile virale minoritare și scumpă.

Există 2 tipuri de teste: teste fenotipice clasice și testele ce utilizează virusurile recombinante.

- Testele clasice pornesc de la izolarea virusului din limfocitele sângelui periferic (PBMC). Izolatul viral este apoi cultivat în prezența unei game de concentrații crescătoare de antiretrovirale pe limfocite de la un donator de sânge HIV seronegativ. Inhibarea replicării virale este evaluată după 7-10 zile de cultură prin determinarea diminuării în supernatantul culturilor a producției de antigen p24 sau a activității reverstranscriptazei.

- Metodele fenotipice recombinante necesită o infrastructură sofisticată și un personal numeros și înalt calificat. Mai recent au fost construiți roboți pentru efectuarea fenotipării permițând obținerea rezultatelor în maximum 10 zile. Sunt însă foarte costisitori, utilizarea lor fiind accesibilă numai unui număr redus de laboratoare.

Testele fenotipice comerciale cu virus recombinant au denumiri sugestive: Antivirogram® (*Virco*) sau Phenosense® (*Virologic*). Un compromis între testele genotipice și cele fenotipice este fenotiparea virtuală propusă de Virco.

Fenotiparea virtuală reprezintă un estimat probabil al fenotipului real derivat dintr-un genotip. Algoritmul este următorul: se citește secvența genică a tulpinii izolate de la pacient și se identifică mutațiile, apoi se consultă baza mondială de genotipuri și fenotipuri și se localizează toate genotipurile cu aceleași mutații. În final, se cercetează fenotipurile corespunzătoare acestor genotipuri și se deter-

mină rezistența prin calcularea mediei aritmetice a acestor fenotipuri. În concluzie, testele de genotipare pentru determinarea rezistenței sunt cele mai ieftine, însă oferă numai informații calitative. Fenotiparea este scumpă și laborioasă, dar produce informații cantitative. Combinarea celor două metode împreună cu accesul la bazele de date existente va permite obținerea unor profiluri de rezistență comprehensive și reproductibile.

Dificultățile întâmpinate de clinicieni și chiar de experți în interpretarea datelor crude de rezistență sunt considerabile. Sunt cunoscute în jur de 250 de mutații care interacționează complex în inducerea rezistenței: mutații potențatoare, mutații care vizează un medicament sau mai multe medicamente (clase), mutații care reversează rezistența. Maniera actuală de interpretare a rezistenței variază de la un laborator la altul. Practic există mai multe criterii de interpretare:

- judecata subiectivă (bazată pe experiență),
- aplicarea unor tabele de mutații și de droguri a căror rezistență este indusă,
- aplicarea unui algoritm de reguli privit ca o alternativă la celelalte două de mai sus (Hirsch MS et al. Clin. Infect. Dis 2003;37:113-128),
- aplicarea recomandărilor europene pentru interpretarea datelor de rezistență, validate clinic (Vandamme AM et al. Antiviral Therapy 2004;9:829-848).

FARMACOLOGIE ȘI TOXICITATE

Studii mai vechi au subliniat interferențe între medicamentele asociate în privința absorbției, distribuției, metabolizării și toxicității. Datele mai noi adaugă alte surse de variabilitate în privința rezultatelor politerapiei. Acestea țin de polimorfismul genetic al pacientului, de alte medicamente nespecifice administrate simultan (inclusiv ceaiuri sau alte preparate naturiste), de dietă. Cele mai multe anti-retrovirale (NNRTI și PI) sunt inductori (1), substraturi (2) sau inhibitori (3) ai sistemului citocrom P450 hepatic (Cyp450). Prescrierea simultană a mai multor medicamente care sunt detoxificate de Cyp450 poate conduce la fenomene variate, de la subdozare la toxicitate. Ritonavirul (inhibitor de proteaze) este cel mai cunoscut inhibitor al Cyp450. El este greu tolerat și, de aceea, se prescrie subdozat, pentru efectul colateral de ameliorare a profilului farmacocinetic al medicamentelor cu care este asociat. În general, asocierile medicamentoase se aleg pentru a permite:

- un index terapeutic care să tolereze variabilități (și erori) individuale largi;

- administrarea a cât mai puține doze zilnic;
- evitarea selecției mutantelor polirezistente.

În legătură cu polirezistența, un mecanism nou a fost recent evidențiat: activarea glicoproteinei P (pompa de eflux) care "pompează" medicamentele extracelular. Pe de altă parte, aceeași glicoproteină P poate facilita accesul unor medicamente în sanctuarele altfel inaccesibile unor inhibitori de protează (în SNC sau în tractul genital, de exemplu).

Disponibilitatea bolnavilor de a tolera efectele toxice ale unor antiretrovirale a scăzut odată cu amendarea imaginii SIDA, care nu mai este considerată maladie iminent letală. Politerapia cronică a oferit posibilitatea diferențierii între simptomele bolii și simptomele asociate reacțiilor adverse sau toxicității medicamentelor. Între ultimele, cele mai atent investigate au fost asociate cu administrarea PI: intoleranța la insulină, creșterea concentrației colesterolului și trigliceridelor serice, redistribuirea țesutului adipos periferic (lipodistrofia extremităților și adipozitatea trunchiului).

Reconsiderarea farmacokinetică a antiretroviralilor (ART) a condus la propunerea unor noi coeficienți de evaluare pornind de la faptul că definiția concentrațiilor inhibitorii se face pe teste in vitro, care nu corespund calităților substanței in vivo, mai ales când este vorba de prodruguri. Activitatea inhibitorie a acestora din urmă depinde de sisteme enzimatice celulare, care asigură conversia prodrugului în forma activă. Astfel, se determină:

- **coeficientul de inhibiție (IQ)** egal cu concentrația drogului în plasmă/ IC_{50} in vitro;
- **coeficientul de "scuză" (FQ)** egal cu IQ după o zi de întrerupere.

"Coeficientul de scuză" (FQ) indică o calitate ignorată până acum a ART, și anume păstrarea unei concentrații plasmatice active chiar în cazul abaterilor frecvente de la posologie. În plus, pentru unele medicamente (NRTI) nici concentrația drogului în plasmă nu este relevantă, ci s-ar impune determinarea concentrației intracelulare. Acești noi coeficienți derivă din posibilitatea determinării rapide (prin cromatografie) a concentrației medicamentelor nelegate de proteine în plasmă. Monitorizarea individuală a concentrației medicamentelor a evidențiat diferențe individuale mari și, în plus, faptul că farmacokinetică este diferită la copii, care nu sunt, și nu trebuie considerați "adulți mici". Factori multipli influențează concentrația intracelulară a medicamentului, concentrație care nu este totdeauna proporțională cu cea plasmatică. Între parametrii care sunt monitorizați pentru a crește disponibilitatea intracelulară, menționăm:

- legarea de proteinele plasmatice,

- eficiența transportului intracelular
- inhibarea pompei de eflux celular.

În plus, pot avea importanță inhibarea detoxifierii hepatice (pe calea Cyp450) și influențarea aceluiasi sistem citocrom din peretele intestinal. Parametrii farmacologici ai unui ART ameliorat se ghidează după următoarele caracteristici:

- Timp de înjumătățire ($T_{1/2}$) plasmatic prelungit, care, ideal, să dea posibilitatea administrării unei singure doze zilnic.
- Reacții adverse minime, determinând îmbunătățirea complianței.
- Profil de rezistență favorabil din cel puțin două puncte de vedere: evitarea rezistenței încrucișate și promovarea "ameliorării" farmacokinetice (cazul binecunoscut al ritonavirului administrat în combinații cu alți PI).

Reacțiile adverse se definesc ca evenimente neplăcute sau injurii, rezultate din administrarea unor medicamente și care anticipează pericolul repetării în cazul administrării ulterioare. Medicii și pacienții trebuie avertizați asupra acestor eventualități, pentru a putea modifica doza sau chiar pentru a întrerupe tratamentul. De asemenea, trebuie formulate instrucțiuni specifice pentru monitorizarea efectelor adverse.

O metaforă sugestivă privind combinațiile ART și rolul lor în prevenirea instalării rezistenței tulpinilor HIV spune că opțiunea clinicianului oscilează între "a sări obstacolul" (a mări doza de ART) sau "de a trece pe lângă obstacol" (de a diversifica terapia, apelând la droguri noi). Opțiunea pentru escaladarea dozei este limitată de efectele adverse, de accelerarea eliminării drogului (în special, pentru PI) prin activarea pompei de eflux, precum și de prețul de cost. Diversificarea este încercată prin modificarea structurată a posologiei. Există mai multe opțiuni pentru eludarea rezistenței la antiretrovirale: creșterea dozei, apelarea la noi combinații, formularea de noi asocieri medicamentoase, modificarea datelor de farmacokinetică etc.

Sinteză

Dezideratele terapiei antivirale sunt: supresie virală maximă și durabilă; restaurarea sau conservarea imunologică; îmbunătățirea calității vieții (minimizarea reacțiilor adverse); scăderea morbidității și mortalității corelate cu infecțiile virale. Metodele de obținere a dezideratelor propuse în tratamentul virustatic se pot rezuma astfel:

- Creșterea aderenței la tratament.
- Introducerea rațională a medicamentelor (în funcție de mecanismul rezistenței).
- Păstrarea unor opțiuni terapeutice de rezervă.
- Folosirea testelor de rezistență în anumite situații clinice.

BIBLIOGRAFIE

Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection, US Department of Health and Human Services. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/>

Hirsch MS et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. Clin. Infect. Dis. 2003;37:113-128.

The EuroGuidelines Group for HIV Resistance. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendations for the European setting. www.euroguidelines.org

INDEX

A

- Adenoasociate, virusuri 293, 295, 296
- Adenoviridae 30, 317-323
- Adenovirus/uri 162, 293, 295, 296, 367, 390
- Alphaherpesvirinae 336-340, 346
- Alpharetrovirus 248
- Alphavirus/uri 27, 218
- Amfotrope, virusuri 244
- Aphtovirus 26
- Arboviridae 215-225
- Arbovirus/uri 103, 215-217, 224
- Arenaviridae 172, 220-221, 224
- Arenavirus/uri 220, 241, 364, 366
- Arteriviridae 28, 165
- Asibi, virus 219
- Astroviridae 163
- Astrovirus/uri 27, 162, 163
- Avulavirus 202

B

- B19, parvovirus 292, 293
- Betaherpesvirinae 336, 341-342, 347
- BK 69, 327
- Bornaviridae 172
- Bunyamwera, virus 220
- Bunyaviridae 28, 172, 219-220, 224
- Bunyavirus/uri 215, 217, 219, 223, 366

C

- Caliciviridae 27, 160-161, 163
- Calicivirus/uri 160-161, 286
- Canarypox, virus 354
- Cardiovirus 26
- CHINA, virus 32
- Choriomeningitei limfocitare, virusul 103, 220
- Citomegalic, virus 336, 341
- Coronaviridae 29, 161-162, 165-170
- Coronavirus/uri 27, 162, 165
- Cowpox, virus 350, 357
- Coxsackie, virus 26, 142, 152, 367

D

- Densovirus/uri 292, 293
- Dependovirus/uri 30, 292, 295, 296, 320
- Dezoxiribovirusuri 30, 32, 390

E

- Ebola, virus/agent 29, 238-239, 366
- ECHO, virusuri 26, 142, 152, 367
- Ecotrope, virusuri 244
- Encefalitei de căpușă, virusul 223
- Enterovirus/uri 26, 103, 142, 152, 153, 367
- Epstein-Barr, virus 32, 58, 103, 336, 343, 390

F

- Febrei aftoase, virusul/urile 142
- Febrei Denga, virusul 219
- Febrei galbene, virusul 219
- Febrelor hemoragice, virusurile 366
- Febrei hemoragice Omsk, virusul 223
- Febrei Lassa, virusul 220, 366
- Filoviridae 29, 172, 237-242
- Filovirus/uri 237, 238, 241, 366
- Flaviviridae 28, 219, 224, 272, 274, 282, 288, 367
- Flavivirus/uri 215, 219, 366

G

- Gammaherpesvirinae 343-346, 347
- Gammaretrovirus 248
- Gripal/e, virus/uri 172, 174, 175, 179, 184, 396
- Gripei aviare, virusul/urile 188, 196

H

- Hantavirus 219, 220, 364
- Hendra, virus 365
- Hepacivirus 27, 217, 219, 274, 282
- Hepadnaviridae 31, 299-315
- Hepadnavirus/uri 300, 391
- Heparnavirus 26, 142, 267, 271
- Hepatitei A, virusul 267-271

- Hepatitei B, virusul 299-307, 315, 391
 Hepatitei C, virusul 219, 271-283, 396
 Hepatitei D, virusul 283-285
 Hepatitei E, virusul 160, 285-286
 Hepatitelor nonA nonB, agenții 32, 285
 Herpes simplex 1, virus 336, 337, 339
 Herpes simplex 2, virus 336, 337, 339
 Herpesviridae 32, 333-340
 Herpesvirus/uri 293, 295, 296
 HH5 32
 HH6 32, 342
 HH7 32, 342
 HH8 32, 260, 343, 344, 391
 HIV (1, 2) 29, 249-264, 272, 368, 391, 396, 401
 HTLV I 29, 244, 245, 384
 HTLV II 29, 244
- I**
 Influenza, virusuri 169, 171, 187
- J**
 JC, virus 69, 260, 327
- K**
 Kemerevo, grup 224
- L**
 La Crosse, virus 220
 LAV 244
 Lentivirinae 29, 244, 249
 Lentivirus/uri 248, 257
 Lyssavirus 227, 228, 235
- M**
 Marburg, virus/agent 29, 238, 239, 366
 Metapneumovirus/uri 202, 203, 208, 212
 Molluscipox, virus 350
 Molluscum contagiosum, virus 260, 350
 Monkeypox, virus 350, 354, 355, 361
 Mononegavirale 24, 172
- Morbillivirus 28, 202, 209, 211
 Mozaicului tutunului, virusul 12
- N**
 Nairovirus 217
 Newcastle, virus/agent 202
 Nidovirales 24, 165
 Nipah, virus 365
 Norovirus/uri 160, 163
 Norwalk, virus/agent 27, 160, 161, 163
- O**
 Oncovirinae 29, 244
 Oncovirusuri lente 244, 386
 Oncovirusuri rapide 244, 386
 Orbivirus/uri 29, 156, 215, 224
 Oreionului, virusul 202, 212
 Orf, grup 350, 361
 Orthomixoviridae 28, 171-185
 Orthomixovirus/uri 172, 204
 Orthopox, virus/uri 349, 350, 355, 357
- P**
 Papillomavirinae 30
 Papilloma, virus/uri 325, 326, 327, 328, 330, 384, 388, 389, 390, 391
 Papova, virus/uri 325, 327, 390
 Papovaviridae 30, 321, 325-331
 Paragripal/e, virus/uri 204
 Paramixoviridae 28, 172, 201-212
 Parapox, virus 350
 Paravaccinal, virus 350
 Parvoviridae 30, 291-298
 Parvovirus/uri 30, 292-298
 PERV 247, 248
 Pestivirus 27
 Picornaviridae 26, 141-154, 267, 271
 Picornavirus/uri 143, 267, 270, 286
 Pneumovirinae 202
 Pneumovirus/uri 28, 202, 207, 212
 Poliovirus/uri 103, 142, 145, 147, 268
 Poliovirus Sabin 145, 146
 Poliovirus VDPV 146, 150, 151
 Polyomavirinae 30, 330
 Polyoma, virus/uri 326, 327, 329, 330, 389

Poxviridae 349-361

Poxvirus/uri 350, 351, 391

Prioni 12, 103, 365, 373, 375, 376

Provirus/uri 64, 243, 245, 246, 247, 254, 386

R

Rabic, virus 103, 227, 228, 229, 230, 232, 235

Reoviridae 29, 156

Reovirus/uri 29, 156

Respirator sîncîţial, virus 202, 204, 206-208

Respirovirus 202, 212

Retroviridae 29, 243-248

Retrovirus/uri 243-247, 300, 395

Ribovirus/uri 26, 32, 286, 391, 395

Rhabdoviridae 28, 172, 227-235

Rhinovirus/uri 26, 142, 152

Rotavirus/uri 29, 156-159, 163

Rubivirus 27, 218

Rubulavirus 202, 212

Rujeolos, virus 103, 202, 208-211

S

Sabia, virus 366

Sapporo, virus 163

Sarcomului Kaposi, virusul (HH8) 343, 344

Sarcomului Rous, virusul 243, 244

SARS, virus 170

SARS-CoV 166, 167, 168, 169

SIV 249, 252, 257, 368

Spumavirinae 29, 244

Spumavirus 248

St. Louis, virus 219, 224, 364

Stomatitei veziculare, virusul 227

SV40, virus 320, 321, 326, 328

T

Tahyna-Lumbo, virus 224

Togaviridae 27, 218, 224

Togavirus/uri 218

Torovirus 165

U

Urlian, virus 103, 202, 205

V

Vaccinei, virusul 350, 354

Vaccinia, virus 240, 359, 361

Varicela-zoster, virus 32, 60, 334, 338, 339, 353

Variolei, virusul 350

Veziculovirus 227

Viroizi 12

W

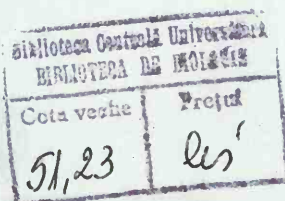
West Nile, virus 219, 224, 364, 367

X

Xenotrope, virusuri 244

Z

Zona zoster 69, 123, 338



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 978-973-39-0637-7

